

I PENDAHULUAN

Bab ini menguraikan mengenai: (1) Latar Belakang, (2) Identifikasi Masalah, (3) Maksud dan Tujuan Penelitian, (4) Manfaat Penelitian, (5) Kerangka Pemikiran, (6) Hipotesa Penelitian, dan (7) Tempat dan Waktu Penelitian.

1.1 Latar Belakang

Buah murbei mengandung nutrisi penting yang dapat meningkatkan kesehatan. Nutrisi dalam murbei meliputi protein, karbohidrat serta vitamin dan mineral seperti kalsium, fosfor, kalium, magnesium, potassium, dan serat.

Ditinjau dari komposisi kimiawi buahnya, tanaman murbei memiliki zat aktif antosianin sebagai antioksidan dan memiliki senyawa-senyawa penting yang menguntungkan bagi kesehatan manusia. Diantaranya adalah kandungan cyanidin yang berperan sebagai antosianin, sakarida, asam linoleat, asam stearat, asam oleat, dan vitamin A, vitamin B1, vitamin B2, serta vitamin C. Keunggulan yang dimiliki ini menjadikan tanaman ini berpotensi untuk diolah menjadi produk pangan fungsional yang memiliki nilai tambah di masyarakat salah satunya yaitu *vinegar* murbei. Buah murbei yang digunakan dalam proses pengolahan *vinegar* ini yaitu menggunakan buah murbei yang telah matang dengan ciri-ciri fisiknya berwarna ungu kehitaman (Deny, 2013).

Kandungan buah murbei segar dalam 112 gram yaitu energi 30 kkal, kadar air 88%, serat 1%, karbohidrat 7 gram, protein 1 gram, lemak 0 gram, Ca 27 mg, K 136 mg, dan F 27 mg.

Vinegar atau lebih dikenal dengan istilah asam asetat banyak digunakan dalam bidang industri makanan. *Vinegar* adalah suatu produk yang dihasilkan dari

perubahan alkohol menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat. *Vinegar* dapat dihasilkan dari sari buah apel, anggur, ceri, pisang dan pir. *Vinegar* dapat digunakan sebagai bahan penyedap (untuk memperbaiki flavor) pada berbagai masakan atau sebagai minuman setelah dilakukan proses *aging* atau penuaan, yang memberikan keistimewaan tersendiri karena flavornya (perpaduan antara rasa dan aroma) yang baik (Yusuf, 2004).

Vinegar (cuka) dibuat melalui 2 tahapan fermentasi. Pertama, fermentasi alkohol yaitu glukosa diubah menjadi alkohol oleh *Saccharomyces cerevisiae* secara anaerob. Kedua, yaitu fermentasi asam asetat oleh *Acetobacter aceti* yang mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat secara aerob. Kedua fermentasi tersebut biasanya dilakukan secara terpisah (Desrosier, 2008).

Dengan mengembangkan bahan pangan berupa murbei ini dapat terus bertahan dengan berbagai inovasi. Kualitas *vinegar* murbei ini dapat dipengaruhi oleh beberapa perlakuan pada saat pengolahan. Dalam proses pengolahan *vinegar* murbei ini terdapat beberapa faktor yang harus diperhatikan, antara lain yaitu pemilihan mikroba, karena bakteri yang memenuhi syarat itu yaitu yang produktivitasnya tinggi dan mempunyai rasa yang enak. Kualitas bahan dasar, dimana semua bahan yang dapat difermentasikan menjadi alkohol bisa dari jus, dari buah-buahan, seperti buah apel, anggur, jeruk, bahan-bahan yang mengandung gula, bir dan *wine*. Fermentasi oleh *yeast*, dimana *yeast* yang dipakai harus diseleksi. Keasaman, dimana kadar alkohol terbaik dan dapat segera difermentasikan. Media pendukung, digunakan untuk memperluas luas permukaan yang berhubungan dengan udara serta tempat melekatnya koloni

bakteri asam cuka sehingga proses fermentasinya menjadi lebih cepat, dan yang terakhir adalah suhu dan lamanya fermentasi menjadi acuan terhadap kualitas dari *vinegar* murbei itu sendiri.

1.2 Identifikasi Masalah

Berdasarkan latar belakang, maka masalah yang dapat diidentifikasi adalah :

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi inokulum terhadap kualitas *vinegar* murbei yang dihasilkan.
2. Bagaimana pengaruh lama fermentasi terhadap kualitas *vinegar* murbei yang dihasilkan .
3. Bagaimana pengaruh interaksi inokulum terhadap lama fermentasi terhadap kualitas *vinegar* murbei yang dihasilkan.

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

Maksud dan tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah :

Maksud penelitian ini untuk mengetahui konsentrasi inokulum yang digunakan dalam pembuatan *vinegar* murbei serta untuk mengetahui lama fermentasi terbaik terhadap kualitas *vinegar* murbei.

Tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan konsentrasi inokulum terbaik dan lama fermentasi terbaik dalam proses pengolahan *vinegar* sehingga dapat menghasilkan kualitas *vinegar* dengan beberapa karakteristik yang dapat menarik minat masyarakat terhadap *vinegar* dengan mengolah buah murbei menjadi *vinegar*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Memanfaatkan produk hasil tanah Indonesia yang melimpah.
2. Memperkenalkan kepada masyarakat mengenai bahan pangan murbei yang dikembangkan menjadi *vinegar* murbei.
3. Memperkenalkan khasiat murbei dengan mengolahnya menjadi *vinegar* murbei
4. Diharapkan dapat meningkatkan nilai ekonomis, atau mengembangkan pengolahan murbei menjadi produk *vinegar* yang baru dalam rangka diversifikasi pangan, serta dapat memperpanjang umur simpan.

1.5 Kerangka Pemikiran

Buah murbei mengandung nutrisi penting yang dapat meningkatkan kesehatan. Nutrisi dalam murbei meliputi protein, karbohidrat serta vitamin dan mineral seperti kalsium, fosfor, kalium, magnesium, potassium, dan serat. Kandungan air yang tinggi pada murbei juga menjadikannya sebagai buah yang rendah kalori. Satu cangkir murbei sama dengan 60 kalori. Murbei mengandung antosianin, yakni sejenis antioksidan tinggi yang dapat membantu mempertahankan kekebalan tubuh, mencegah kanker, dan diabetes. Tingginya kadar vitamin C dan flavonoid merupakan suplemen yang baik untuk mengatasi penyakit flu dan kekebalan tubuh. Buah murbei berkhasiat mengobati berbagai jenis penyakit seperti, jantung berdebar, sembelit, hepatitis, cacingan, radang mata merah, tekanan darah tinggi, vertigo, insomnia dan asma (Deny, 2013).

Hasil penelitian Deny (2013), menyimpulkan bahwa kadungan air dalam buah murbei segar adalah 80,18%. Hal ini dikarenakan buah yang digunakan

adalah buah yang sudah matang. Nilai pH buah murbei dari hasil penelitian yaitu 3,4. Nilai pH yang cukup rendah ini dipengaruhi oleh keberadaan komposisi buah murbei yang sebagian besar terdiri dari asam-asam penyusunnya, seperti asam linoleat, asam stearat, asam oleat, dan terutama asam askorbat yang rata-rata kandungannya sebesar 5 mg/100 gram. Kandungan vitamin C yang terdapat pada buah murbei segar ini dari hasil penelitian yaitu sebesar 37,06 mg/100 gram.

Vinegar atau lebih dikenal dengan istilah asam asetat banyak digunakan dalam bidang industri makanan. *Vinegar* adalah suatu produk yang dihasilkan dari perubahan alkohol menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat. *Vinegar* dapat dihasilkan dari sari buah apel, anggur, ceri, pisang dan pir. *Vinegar* dapat digunakan sebagai bahan penyedap (untuk memperbaiki flavor) pada berbagai masakan atau sebagai minuman setelah dilakukan proses *aging* atau penuaan, yang memberikan keistimewaan tersendiri karena flavornya (perpaduan antara rasa dan aroma) yang baik (Yusuf, 2004).

Menurut Prescott and Dunn (1959), cuka (*vinegar*) merupakan penyedap makanan yang dibuat dari bahan bergula atau mengandung pati melalui proses fermentasi alkoholik diikuti fermentasi asam asetat yang mengubah alkohol menjadi asam asetat secara aerob. Dalam keadaan yang sangat baik jumlah asam asetat yang dihasilkan berkisar 50 % dari jumlah alkohol.

Hasil penelitian Dian Widiastuti (2013), pada proses pembuatan alkohol dari anggur didapat kadar alkohol yaitu 12,2711% diperoleh pada pH 4 dengan waktu fermentasi selama 84 jam dan penambahan ragi sebanyak 1,5 gram. Hal

tersebut terjadi karena pada kondisi tersebut fermentasi dapat berjalan dengan baik, sehingga glukosa dapat terurai menjadi alkohol pada pH 4.

Proses pembuatan *vinegar* melibatkan 2 tahap, yaitu pertama glukosa diubah menjadi alkohol secara anaerob oleh *Saccharomyces cerevisiae* (alkoholisasi). Setelah itu alkohol akan diubah menjadi asam asetat oleh *Acetobacter aceti* secara anaerob (Tjahjedi dan Marta, 2008). Kedua proses tersebut biasanya dilakukan secara terpisah (*stepwise inoculation process*), sehingga memerlukan waktu yang cukup lama. Oleh karena itu penggabungan proses alkoholisasi dan asetifikasi (*simultaneous inoculation process*) merupakan salah satu solusi untuk menanggulangi masalah tersebut. Penggunaan kultur campuran *Saccharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti* yang dilakukan secara simultan diharapkan dapat menghasilkan *vinegar* murbei dengan aroma yang baik, prosedur operasional yang lebih mudah dan lebih disukai oleh konsumen.

Hasil penelitian Kondo (1996), menyimpulkan bahwa kadar asam asetat dari kulit pisang yang dihasilkan dari *simultaneous inoculation process* (proses fermentasi yang dilakukan secara terpisah) sebesar 6,23%. Sedangkan dengan metode *stepwise inoculation process* (proses fermentasi yang dilakukan dengan menggabungkan proses alkoholisasi dan asetifikasi) sebesar 5,75%. Hal ini memperlihatkan bahwa penggunaan kultur campuran dengan metode *simultaneous inoculation process* menghasilkan asam asetat yang lebih baik daripada *stepwise inoculation process*. Hasil penelitian *vinegar* lainnya yang menggunakan kultur campuran *Saccharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti*

secara simultan menghasilkan kadar asam asetat sebesar 6,47% pada waktu inkubasi selama 10 hari (Rosada, 1999).

Hasil penelitian Rosdiana (2004) produksi *vinegar* melalui fermentasi bertahap pada nanas menghasilkan kadar asam asetat tertinggi pada konsentrasi inokulum *Saccharomyces cerevisiae* 5% dan *Acetobacter aceti* 15% dengan penambahan gula awal 10%.

Menurut Ari Susilowati (2001), fermentasi alkoholik dengan penambahansukrosa 5% dan 10% dan pemberian inokulum 10%,15%, 20% menghasilkan alkohol yang cukup tinggi. Konsentrasi alkohol yang dicapai berkisar antara 7,23-14,57% v/v, dengan lama fermentasi 72jam.

Menurut Frist Silia (2013), konsentrasi gula yang baik untuk permulaan fermentasi yang baik adalah 16%, hal ini bertujuan untuk mempercepat pertumbuhan khamir pada awal fermentasi. Penambahan gula akan mengarahkan fermentasi lebih sempurna yang menjamin kestabilan anggur yang dihasilkan serta menghasilkan alkohol yang tinggi. Kadar gula minimum untuk pertumbuhan khamir yaitu 10%.

Menurut Prescott dan Dunn (1959), kadar gula yang sering digunakan pada fermentasi adalah 12%. Konsentrasi gula yang terlalu tinggi selama fermentasi alkohol berlangsung akan menghambat aktivitas khamir untuk memproduksi alkohol. Untuk mendapatkan pH yang optimum (4,0-4,5) dapat dilakukan dengan menambahkan asam, misalnya asam sitrat, tartar atau malat dan bisa juga dengan menambah basa, misalnya KOH. Selama fermentasi berlangsung pH akan

menurun dari pH semula. Penurunan pH terjadi karena sebagian alkohol diubah menjadi asam-asam organik.

Memproduksi asam asetat dari air kelapa membutuhkan penambahan gula sebesar 10-12%, karena kandungan gula yang rendah pada air kelapa (mengandung 2.6% gula). Fermentasi asam asetat dimulai pada saat terbentuk 5% etanol pada air kelapa (Ari, 2001). Cara lain adalah dengan memberi starter (*Acetobacter aceti*) secara langsung tanpa melakukan tahap fermentasi alkohol terlebih dahulu, sehingga fermentasi alkohol spontan yang terjadi dapat langsung terfermentasi menjadi asam asetat.

Menurut Rosada (1999) menggunakan kultur campuran dengan substrat apel bahwa perbandingan konsentrasi inokulum *Saccharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti* 7 : 3 yang menghasilkan kadar asam asetat tertinggi sebesar 6,47% setelah 10 hari inkubasi dengan agitasi 150 rpm dan tanpa penambahan gula awal.

Produk akhir dari suatu proses fermentasi diantaranya tergantung pada konsentrasi inokulumnya. Menurut Rachman (1989), inokulum yang ditambahkan ke dalam sari buah yang difermentasi berkisar 3-10%. Jumlah konsentrasi inokulum yang digunakan dalam medium cair adalah 5-15%. Khoirul (2004), menyatakan bahwa jumlah total inokulum yang baik harus sebanding dengan jumlah substratnya.

Menurut Daulay (1992), bahan baku pembuatan asam asetat dari sari buah perlu dipematkan terlebih dahulu atau ditambahkan gula (sukrosa) sampai kandungan gulanya mencapai 10-25%.

Semakin lama waktu fermentasi, maka kadar gula reduksinya semakin menurun, hal ini disebabkan karena selama fermentasi mikroba akan memecah gula-gula tersebut untuk melangsungkan hidupnya dan menghasilkan senyawa metabolit berupa asam-asam organik. Selama proses fermentasi gula akan diurai oleh *yeast* dan berubah menjadi gas (CO_2) serta berbagai asam organik dan senyawa yang lain (Frank, 1996).

Proses fermentasi melalui jalur glikolisis memecah glukosa untuk menghasilkan asam piruvat. Asam piruvat dalam kondisi anaerob akan mengalami penguraian oleh piruvat dekarboksilase menjadi asetaldehid, selanjutnya asetaldehid dirubah oleh alkohol dehidrogenase menjadi etanol dan karbondioksida (Madigan, 2002).

Perlakuan lama fermentasi juga mempengaruhi nilai total asam, dimana semakin lama waktu fermentasi maka nilai total asamnya akan mengalami peningkatan. Peningkatan nilai total asam terjadi akibat adanya produksi asam-asam organik selama fermentasi. Selama proses fermentasi, *Saccharomyces cerevisiae* akan melakukan metabolisme terhadap sukrosa dan menghasilkan sejumlah asam-asam organik seperti asam asetat, asam glukonat dan asam glukoronat (Sreeramulu, 2000 dan Frank, 1996).

Berdasarkan hasil penelitian Reddy (2005), menyatakan bahwa semakin lama waktu fermentasi, maka kadar alkohol yang diperoleh juga semakin besar. Hal ini disebabkan karena lamanya waktu fermentasi maka semakin banyak kesempatan mikroorganisme untuk memecah glukosa menjadi alkohol (Abdul Azis Darwis, 1995). Serta kadar alkohol tertinggi dihasilkan pada pH 4

karena kondisi terbaik bagi pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* adalah 4-4,5(Waluyo, 1984).

Pada pH 4 dapat memberikan kenaikan kadar alkohol karena bakteri dapat dihambat pertumbuhannya sehingga *yeast* dapat tumbuh dengan baik sehingga menghasilkan alkohol maksimal pada minuman. Kondisi pH yang terlalu asam tidak memberikan hasil yang baik, begitu pula pada kondisi mendekati normal. Hal ini disebabkan karena *yeast* tidak dapat tumbuh dengan baik, tetapi sangat baik untuk mikroba lain (Frazier, 1988).

Penurunan pH disebabkan karena semakin lama fermentasi akan dihasilkan asam-asam organik. Asam-asam organik yang terlarut akan melepaskan proton (H^+) sehingga menurunkan pH. Selama proses fermentasi, *Saccharomyces cerevisiae* melakukan metabolisme terhadap sukrosa dan menghasilkan sejumlah asam-asam organik seperti asam asetat dan asam glukonat, oleh karena itu terjadi peningkatan kadar asam dan terjadi penurunan pH (Sreeramulu, 2000).

Menurut Bisson (2001), *Saccharomyces cerevisiae* mempunyai kemampuan untuk menghasilkan senyawa fenol, dimana asam-asam organik yang dihasilkan selama fermentasi berperan sinergis dan dapat meregenerasi senyawa antioksidan primer yang terkandung dalam buah murbei. Selain itu, kondisi asam akibat adanya asam-asam organik selama fermentasi dapat meningkatkan aktivitas antioksidan (khususnya antioksidan primer) lebih stabil pada suasana asam.

Semakin banyak ragi yang ditambahkan, maka semakin banyak pula mikroorganisme yang mampu memecah glukosa menjadi alkohol. Sehingga kadar alkohol yang dihasilkannya pun menjadi lebih tinggi (Agus Kresno, 2002).

Temperatur optimal untuk *yeast* adalah antara 25-30°C dan temperatur maksimalnya adalah 35-47°C. Pengkondisian suhu yang dilakukan dengan menggunakan inkubator, hal ini dilakukan agar suhu dapat terkontrol dengan baik. Pada awal fermentasi aktivitas enzim masih sangat rendah. Aktivitas enzim akan meningkat sejalan dengan bertambahnya waktu fermentasi dan menurun pada hari ke-10. Hal ini terjadi mengikuti pola pertumbuhan mikroorganisme yang mengalami beberapa fase pertumbuhan diantaranya yaitu fase adaptasi, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian (Abdul Azis Darwis, 1995).

Menurut Adams (1985), bakteri asam asetat dapat tumbuh secara optimal pada pH 5,4 – 6,3 dan proses fermentasinya berlangsung dalam jangka waktu 12 hari dengan menghasilkan asam asetat 3,5 %.

Menurut Ratnasari (2009), kadar asam asetat tertinggi diperoleh dari perbandingan konsentrasi inokulum *Saccharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti* 7% : 3% yang dihasilkan pada masa inkubasi 14 hari. Dari hasil penelitian memperlihatkan bahwa penggunaan kultur campuran dapat diaplikasikan untuk produksi *vinegar* yang baik.

Menurut Hardoyono (2007), dalam menentukan kondisi optimum fermentasi asam asetat oleh *Acetobacter aceti* didapat pembentukan asam asetat pada pH 5,5 selama 11 hari menghasilkan kadar asam asetat 5-6%. Apabila fermentasi diteruskan maka kadar asam asetat akan mengalami penurunan karena penguapan produk asam asetat oleh proses agitasi atau pengadukan.

Menurut Dersroiser (1988), suhu dan lama pemanasan menyebabkan terjadinya dekomposisi dan perubahan struktur pigmen antosianin yang diakibatkan oleh adanya energi kinetik selama pemanasan.

Menurut Liu(2004), berdasarkan penelitian level antosianin terhadap 31 jenis murbei yang dihitung sebagai *cyanidin 3-glucoside*, berkisar antara 147,68 hingga 2725,46 mg/100gram filtrat.

1.6 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka pemikiran diatas, diduga bahwa :

1. Konsentrasi inokulum yang digunakan berpengaruh terhadap karakteristik *vinegar* murbei yang dihasilkan.
2. Lama fermentasi berpengaruh terhadap kualitas *vinegar* murbei yang dihasilkan.
3. Interaksi antara konsentrasi inokulum dan lama fermentasi berpengaruh terhadap kualitas *vinegar* murbei yang dihasilkan.

1.7 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Pangan, Fakultas Teknik, Universitas Pasundan, Jalan Dr. Setiabudhi No 193 Bandung. Penelitian dimulai pada bulan November 2014.

II TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini menguraikan mengenai: (1) Murbei, (2) *Vinegar*, (3) Fermentasi, (4) Bakteri yang Digunakan Dalam Pembuatan *Vinegar*, dan (5) Asam Asetat.

2.1 Murbei

Tanaman murbei tersebar di seluruh dunia dan dapat bertahan pada berbagai kondisi iklim. Tanaman murbei dapat hidup pada iklim tropis maupun sub tropis sehingga dapat bertahan dengan curah hujan 400-4500 mm/tahun. Meskipun kondisi optimum pertumbuhan murbei pada suhu 18-30°C, akan tetapi tanaman murbei dapat bertahan pada suhu 48°C atau dibawah 0°C, sehingga murbei dapat dianggap sebagai tanaman universal karena kemampuannya tumbuh dimana saja pada berbagai iklim yang bervariasi (DATTA, 2002).

Murbei berasal dari Cina, tumbuh baik pada ketinggian lebih dari 100 m dan memerlukan cukup sinar matahari. Tumbuhan yang sudah dibudidayakan ini menyukai daerah-daerah yang cukup basa seperti di lereng gunung, tetapi pada tanah yang berdrainase baik. Kadang ditemukan tumbuh liar. Pohon, tinggi sekitar 9 m, percabangan banyak, cabang muda berambut halus. Daun tunggal, letak berseling, bertangkai yang panjangnya 4 cm. Helai daun bulat telur sampai berbentuk jantung, ujung runcing, pangkal tumpul, tepi bergerigi, pertulangan menyirip agak menonjol, permukaan atas dan bawah kasar, panjang 2,5 - 20 cm, lebar 1,5 - 12 cm, warnanya hijau. Bunga majemuk bentuk tandan, keluar dari ketiak daun, mahkota bentuk taju, warnanya putih. Dalam satu pohon terdapat bunga jantan, bunga betina dan bunga sempurna yang terpisah. Murbei berbunga sepanjang tahun. Buahnya banyak berupa buah buni, berair dan rasanya enak.

Buah muda warnanya hijau, setelah masak menjadi hitam. Biji kecil, warna hitam. Tumbuhan ini dibudidayakan karena daunnya digunakan untuk makanan ulat sutera. Daun muda enak di sayur dan berkhasiat sebagai pembersih darah bagi orang yang sering bisulan. Perbanyakkan dengan setek dan okulasi. Murbei memiliki sifat kimia dan efek farmakologis, diantaranya yaitu daun bersifat pahit, manis, dingin, masuk meridian paru dan hati. Buah bersifat manis, dingin, masuk meridian jantung, hati, dan ginjal. Kulit akar bersifat manis, sejuk, masuk meridian paru. Ranting bersifat pahit, netral, masuk meridian hati. Daun murbei mengandung ecdysterone, inokosterone, lupeol, beta-sitosterol, rutin, moracetin, isoquercetin, scopolin, alfa-beta-hexenal, cis-beta-hexenol, cis-lambda-hexenol, benzaidehide, eugenol, linalool, benzyl alkohol, vitamin (A, B1, C dan karoten), asam klorogenik, asam fumarat, asam folat, asam formyltetrahydrofolik, dan mioinositol. Bagian ranting murbei mengandung tanin dan vitamin A. Buahnya mengandung cyanidin, isoquercetin, sakarida, asam linoleat, asam stearat, asam oleat dan vitamin (karoten, B1, B2 dan C) (LIPI, 2009).

Tanaman murbei memiliki banyak spesies, diantaranya *Morus alba*, *Morus multicaulis*, *Morus nigra*, *Morus macraura*, *Morus cathayana*, *Morus indica*, *Morus canva*, *Morus Khunpai*, *Morus husan*, *Morus lembang* (BPPT, 2005).

Saat ini terdapat 45.085,5 Ha lahan murbei di Indonesia dan sekitar 9.000 Ha diantaranya terdapat di Jawa barat (BPPT, 2005). Beberapa desa sentra sutra yang terkenal adalah Petarangan dan Karanggintung (Kemrajen), Semedo (Pekuncen), Sikapat (Sumbang) dan Karang Tengah (Cilonggok), di Kabupaten Banyumas. Di desa-desa itulah ratusan petani menanam pohon murbei sebagai

pakan utama ulat sutra. Dilihat dari kenyataannya, tanaman ini mampu memberikan kontribusi produksi yang cukup besar, tetapi dari segi pemanfaatannya di dalam negeri masih sangat minim.

Ditinjau dari komposisi kimiawi buahnya, tanaman murbei memiliki zat aktif antosianin sebagai antioksidan dan memiliki senyawa-senyawa penting yang menguntungkan bagi kesehatan manusia. Diantaranya adalah kandungan cyanidin yang berperan sebagai antosianin, *insoquercetin*, sakarida, asam linoleat, asam stearat, asam oleat, dan vitamin (karotin, B1, B2, C). Keunggulan yang dimiliki ini menjadikan tanaman ini berpotensi untuk diolah menjadi produk pangan fungsional yang memiliki nilai tambah di masyarakat (Deny, 2013).

2.2 Vinegar

Vinegar berasal dari kata *vinaigre* (bahasa Perancis) yang artinya anggur yang telah asam yang merupakan suatu produk yang dihasilkan dari fermentasi bahan yang mengandung gula atau pati menjadi alkohol, yang kemudian difermentasi lebih lanjut menjadi *vinegar* yang mempunyai kandungan asam asetat minimal 4 gram/100 ml (Waluyo, 1984).

Vinegar atau lebih dikenal dengan istilah asam asetat banyak digunakan dalam bidang industri makanan. *Vinegar* adalah suatu produk yang dihasilkan dari perubahan alkohol menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat. *Vinegar* dapat dihasilkan dari sari buah apel, anggur, ceri, pisang dan pir. *Vinegar* dapat digunakan sebagai bahan penyedap (untuk memperbaiki flavor) pada berbagai masakan atau sebagai minuman setelah dilakukan proses *aging* (penuaan), yang

memberikan keistimewaan tersendiri karena flavornya (perpaduan antara rasa dan aroma) yang baik (Yusuf, 2004).

Dalam industri pengolahan makanan, *vinegar* digunakan sebagai bahan penimbul flavor dan bahan pengawet. Beberapa jenis makanan yang ditambah *vinegar* dalam konsentrasi tertentu antara lain adalah tomat, sambal, acar dan sayur asin. Acar (pikel) dalam *vinegar* merupakan salah satu contoh pengawetan makanan secara tradisional. Daya pengawet *vinegar* disebabkan karena kandungan asam asetatnya. Sebanyak 0,1% asam asetat dapat menghambat pertumbuhan bakteri pembentukan spora penyebab keracunan makanan dan 0,3% asam asetat dapat mencegah pertumbuhan kapang penghasil mikotoksin. Pengaruh asam asetat biasanya diperkuat oleh adanya garam (NaCl) dan bahan padat lainnya yang akan menurunkan *water activity* (a_w) pada bahan makanan sampai dibawah optimum untuk pertumbuhan mikroba pembusuk dan penyebab keracunan makanan.

Macam-macam *vinegar* berdasarkan bahan bakunya, yaitu :

1. *Malt Vinegar*

Malt Vinegar merupakan cuka yang terbuat dari gandum dan *barley* yang dikecambahkan. Cuka ini menyebabkan pati dalam biji berubah menjadi maltosa. Maltosa diperam untuk mendapatkan alkohol, setelah itu diubah menjadi cuka. Cuka ini berwarna coklat bening.

2. *White Wine Vinegar*

White Wine Vinegar atau biasa juga disebut dengan *spirit vinegar* yang bahan bakunya adalah alkohol yang dioksidasi. Kebanyakan *white wine vinegar*

merupakan larutan 5% asam asetat. Warna yang dihasilkan yaitu bening. Biasanya dibuat dari biji-bijian (jagung) dan air yang digunakan dalam pembuatan *pickle*.

3. *Wine Vinegar*

Wine Vinegar merupakan cuka yang terbuat dari *wine* putih dan *wine* merah. Kualitas *wine vinegar* yang lebih baik yaitu dimatangkan dalam tong kayu selama 2 tahun dan menghasilkan flavor yang kompleks. *Wine vinegar* mempunyai keasaman yang lebih rendah daripada *cider vinegar*.

4. *Balsamic Vinegar*

Balsamic Vinegar berasal dari Modena, Itali dan merupakan pembuatan cuka secara tradisional. Cuka ini terbuat dari anggur putih varietas *Trebbiano*. Anggur ini dibuat jus pekat terlebih dahulu, kemudian difermentasi dalam tong kayu selama 3 sampai 12 tahun. Warna cuka ini coklat tua dan rasanya manis.

5. *Apple Cider Vinegar*

Apple Cider Vinegar merupakan cuka yang terbuat dari sari buah apel atau bisa juga dari ampas jus apel. Warna cuka ini adalah coklat kekuningan. Pada proses pembuatan cuka ini mengandung *starter* alami dari cuka.

6. *Fruit Vinegar*

Fruit Vinegar merupakan cuka yang terbuat dari berbagai macam buah-buahan yang mengandung gula tinggi. Pada cuka ini tidak diperlukan penambahan flavor karena menghasilkan flavor yang sesuai dengan jenis buah yang digunakan. Flavor umum yang biasa digunakan untuk cuka buah adalah apel, *black current*, *raspberry*, dan tomat.

7. Cuka Kesemek

Cuka kesemek berasal dari Korea. Sesuai dengan namanya, cuka ini dibuat dari buah kesemek. Biasanya digunakan sebagai bahan tambahan makanan pada makanan raja. Lama fermentasinya selama 3 bulan, jika diinginkan flavor yang lebih enak fermentasi dilakukan lebih dari 6 bulan dan fermentasi dilakukan dengan pemeraman.

8. *Rice Vinegar*

Rice vinegar merupakan cuka yang dibuat di daerah Asia Timur dan Asia Tenggara. Terbuat dari beras dan warnanya kuning, merah serta hitam.

9. *Palm Vinegar*

Palm vinegar berasal dari Filipina. Cuka ini terbuat dari getah buah nipa muda yang dikumpulkan selama beberapa hari. Rasanya lebih lembut dan warnanya putih keruh.

10. *Coconut Vinegar*

Coconut vinegar berasal dari Filipina juga. Cuka ini terbuat dari air kelapa, rasanya asam dengan sedikit rasa “*slightly yeast*”. Biasanya digunakan dalam makanan India dan Asia Tenggara. Cuka ini berwarna putih keruh.

11. *Honey Vinegar*

Honey vinegar banyak dibuat di Italia. Cuka ini terbuat dari madu dan cuka ini masih jarang dibuat oleh masyarakat.

12. *Cane Vinegar*

Cane vinegar terbuat dari jus gula tebu dan sangat populer di daerah Ilocos, Filipina Utara. Cuka ini berwarna kuning gelap sampai coklat emas.

13. *Beer Vinegar*

Beer vinegar banyak diproduksi di Jerman, Austria dan Belanda. Flavor yang dihasilkan cuka ini tergantung dengan tipe bir yang digunakan.

14. *Chinese Black Vinegar*

Chinese black vinegar terbuat dari beras, gandum, mollet, sorgum atau kombinasi dari semuanya. Cuka ini memiliki warna hitam pekat seperti tinta dan rasanya seperti gandum. Cuka ini berasal dari Cina.

Cuka sudah dikenal orang sejak peradaban manusia, seperti halnya anggur. Perkataan *vinegar*, nama asing dari cuka, berasal dari kata *vinegre* yang berarti anggur asam. Jika anggur dibiarkan selama beberapa hari di udara akan mengalami fermentasi menjadi asam cuka. Nama lain dari asam cuka adalah acetum. Dari perkataan *acetum* lalu timbul turunan-turunannya di dalam bahasa Inggris: *acetic* dan di dalam bahasa Indonesia adalah asetat (Tjokroadikoesoemo, 1993).

Asam asetat adalah senyawa berbentuk cairan, tidak berwarna, mempunyai bau yang menyengat dan memiliki rasa asam yang tajam sekali. Berat jenis asam asetat adalah 1,049 kg/liter, sedangkan titik didihnya pada tekanan 1 atmosfer adalah 118,1⁰C. Bahan ini larut di dalam air, alkohol, gliserol dan eter, tetapi asam cuka tidak larut dalam karbon disulfida. Suhu perapian asam asetat adalah 427⁰C dan meledak pada batas terendah (*explosion limits*) sebesar kurang dari 4% volume udara (Puturau, 1982).

Cuka merupakan produksi asam asetat yang telah banyak dikenal. Cuka adalah produk yang dihasilkan dari konversi etil alkohol (etanol) menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat dari genus *Acetobacter* dan *Gluconobacter* (Blanc, 1996).

2.3 Fermentasi

Fermentasi merupakan perubahan kimia dalam bahan pangan yang disebabkan oleh enzim. Enzim yang berperan dapat dihasilkan oleh mikroorganisme atau enzim yang telah ada dalam bahan pangan (Buckle, K. A., 1985).

Fermentasi merupakan suatu proses pemecahan karbohidrat dan asam amino secara anaerobik, yaitu tanpa melibatkan oksigen. Senyawa yang dapat dipecah dalam proses fermentasi adalah karbohidrat, sedangkan asam amino hanya dapat difermentasi oleh beberapa jenis bakteri saja (Fardiaz, 1984).

Fermentasi dapat meningkatkan nilai gizi suatu bahan pangan yang berkualitas rendah serta berfungsi dalam pengawetan bahan pangan dan merupakan suatu cara untuk menghilangkan zat antinutrisi atau racun yang terkandung dalam suatu bahan pangan (Satiawihardja, 1992).

Berdasarkan media yang digunakannya, fermentasi secara umum dibagi menjadi dua model utama, yaitu :

1. Fermentasi Media Padat (*Solid State Fermentation*)

Fermentasi media padat merupakan suatu proses fermentasi yang berlangsung dalam substrat tidak larut, namun mengandung air yang cukup sekalipun tidak mengalir bebas. Fermentasi media padat memiliki kandungan

nutrient per volume jauh lebih pekat sehingga hasil per volumenya dapat lebih besar. Fermentasi dengan media padat memiliki keuntungan yaitu medium yang digunakan relatif sederhana, ruang yang diperlukan untuk peralatan fermentasi relatif kecil, karena air yang digunakan sedikit, inokulum dapat disiapkan secara sederhana, kondisi medium tempat pertumbuhan mikroba mendekati kondisi habitat alaminya, aerasi dihasilkan dengan mudah karena ada ruang diantara tiap partikel substratnya dan produk yang dihasilkan dapat dipanen dengan mudah. Pada fermentasi media padat ini memiliki beberapa faktor yang mempengaruhinya, antara lain yaitu kadar air, suhu dan pertukaran gas. Contoh fermentasi dengan media padat seperti fermentasi tempe, oncom, kecap, tape dan silase (Nimas Mayang, 2012).

2. Fermentasi Media Cair (*Submerged Fermentation*)

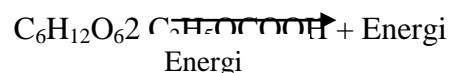
Fermentasi media cair merupakan suatu proses fermentasi yang melibatkan air sebagai fase kontinyu dari sistem pertumbuhan sel atau substrat, baik sumber karbon maupun mineral terlarut sebagai partikel-partikel dalam fase cair. Fermentasi cair dengan teknik tradisional tidak dilakukan pengadukan, berbeda dengan teknik fermentasi cair modern melibatkan fermentor yang dilengkapi dengan pengaduk agar medium tetap homogen, aerasi, pengatur suhu (pendinginan dan pemanasan) dan pengaturan pH. Proses fermentasi cair modern dapat dikontrol lebih baik dan hasil yang lebih seragam dan dapat diprediksi. Juga tidak dilakukan sterilisasi, namun pemanasan, perebusan dan pengukusan mematikan banyak mikroba kompetitor. Jenis-jenis media cair yaitu fermentasi yang diagitasi, dimana substratnya larut dalam air, fermentasi yang diagitasi dimana zat yang tidak larut

dalam air tersuspensi dalam fase cair, fermentasi yang tidak diagitasi dimana zat cair tidak larut dalam air tersuspensi dalam fase cair dan fermentasi yang tidak diagitasi dimana substratnya larut dalam fase cair. Keuntungan dari fermentasi media cair adalah hampir disemua bagian tangki terjadi fermentasi, sedangkan kelemahan dari fermentasi media cair ini adalah biaya operasi relatif mahal. Contoh fermentasi media cair yaitu fermentasi minuman anggur, fermentasi asam cuka, *yoghurt* dan kefir (Nimas Mayang, 2012).

Selain fermentasi media cair dan media padat masih ada beberapa jenis fermentasi antara lain :

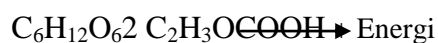
1. Fermentasi Asam Laktat

Fermentasi asam laktat merupakan fermentasi dimana hasil akhirnya adalah asam laktat. Peristiwa ini dapat terjadi di otot dalam kondisi anaerob. Pada proses ini glukosa dipecah menjadi 2 molekul asam piruvat melalui glikolisis, membentuk 2 ATP dan 2 NADH dengan reaksi sebagai berikut :

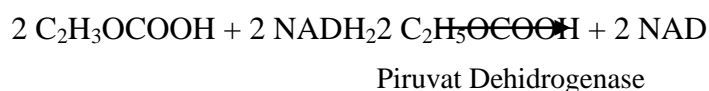


Prosesnya :

1. Glukosa $\xrightarrow[\text{Enzim}]{} \text{asam piruvat (proses glikolisis)}$



2. Dehidrogenasi asam piruvat akan terbentuk asam laktat



Energi yang terbentuk dari proses glikolisis hingga terbentuk asam laktat yaitu :

$$8 \text{ ATP} - 2 \text{ NADH}_2 = 8 - 2(3 \text{ ATP}) = 2 \text{ ATP (Poedjiadi, 1994).}$$

Fermentasi asam laktat terbagi menjadi dua jenis, yaitu homofermentatif (sebagian besar hasil akhir merupakan asam laktat) dan heterofermentatif (hasil akhir berupa asam laktat, asam asetat, etanol dan CO₂). Secara garis besar, keduanya memiliki kesamaan dalam mekanisme pembentukan asam laktat, yaitu piruvat akan dirubah menjadi asam laktat dan diikuti dengan proses transfer elektron dari NADH menjadi NAD⁺. Pola fermentasi ini dapat dibedakan dengan mengetahui keberadaan enzim-enzim yang berperan di dalam jalur metabolisme glikolisis.

Perbedaan kedua kelompok bakteri ini didasarkan juga pada kemampuan bakteri asam laktat dalam menghasilkan enzim fruktosa difosfat aldolase. Bakteri asam laktat homofermentatif mampu menghasilkan enzim fruktosa difosfat aldolase, sedangkan bakteri asam laktat heterofermentatif tidak mampu menghasilkan enzim tersebut tetapi bakteri asam laktat heterofermentatif mampu menghasilkan glukosa 6 fosfat dehydrogenase dan 6 fosfat glukonat dehydrogenase sehingga mempunyai jalur pembentukan asam laktat yang berbeda. Pada heterofermentatif, tidak ada aldolase dan heksosa isomerase tetapi menggunakan enzim fosfoketolase dan menghasilkan CO₂. Metabolisme heterofermentatif dengan menggunakan heksosa (golongan karbohidrat yang terdiri dari 6 atom karbon) akan melalui jalur heksosa monofosfat atau pentose fosfat. Sedangkan homofermentatif melibatkan aldolase dan heksosa aldolase namun tidak memiliki

fosfoketolase serta hanya sedikit atau bahkan sama sekali tidak menghasilkan CO₂. Jalur metabolisme dari yang digunakan pada homofermentatif adalah lintasan Embden-Meyerhof-Parnas (Nimas Mayang, 2012).

Beberapa contoh genus bakteri yang merupakan bakteri homofermentatif adalah *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, dan *Lactobacillus*, sedangkan bakteri heterofermentatif adalah *Leuconostoc* dan *Lactobacillus*. Faktor yang mempengaruhi bakteri asam laktat yaitu lama fermentasi, pH, suhu dan oksigen.

2. Fermentasi Alkohol

Fermentasi alkohol merupakan suatu reaksi pengubahan glukosa menjadi etanol (etil alkohol) dan karbon dioksida. Proses yang terjadi yaitu piruvat diubah menjadi etanol dalam dua langkah. Langkah pertama, menghidrolisis piruvat dengan molekul air sehingga melepaskan karbondioksida dari piruvat dan mengubahnya menjadi asetaldehida berkarbon dua. Dalam langkah kedua, asetaldehida direduksi oleh NADH menjadi etanol sehingga meregenerasi NAD⁺ yang dibutuhkan untuk glikolisis. Organisme yang berperan yaitu *Saccharomyces cerevisiae* (ragi) untuk pembuatan tape, roti atau minuman keras. Reaksi Kimia:



Glukosa etanol

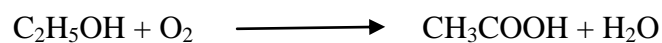
Pada reaksi ini 1 mol glukosa akan membentuk 2 mol etanol dan 2 mol CO₂ serta ATP (energi), atau dengan basis berat 51,1% glukosa diubah menjadi etanol dan 48,9% CO₂. Pada kenyataannya hasil ini tidak tercapai, karena beberapa nutrisi digunakan untuk pertumbuhan dan metabolisme khamir serta terbentuknya

hasil sampingan (asam laktat, asam asetat, asam piruvat, asetaldehid, dan gliserol), sehingga hanya 90-95% dari nilai yang dapat dicapai (Kunkee dan Amerine, 1970).

Beberapa organisme seperti *Saccharomyces cerevisiae* dapat hidup, baik dalam kondisi lingkungan cukup oksigen maupun kurang oksigen. Organisme yang demikian disebut dengan aerob fakultatif. Dalam keadaan cukup oksigen, *Saccharomyces cerevisiae* akan melakukan respirasi biasa. Akan tetapi, jika dalam keadaan lingkungan kurang oksigen *Saccharomyces cerevisiae* akan melakukan fermentasi.

3. Fermentasi Asam Asetat

Fermentasi asam asetat merupakan suatu contoh fermentasi yang berlangsung dalam keadaan aerob. Fermentasi ini dilakukan oleh bakteri asam asetat (*Acetobacter aceti*) dengan substrat etanol. Jika diberikan cukup oksigen, mikroorganisme ini dapat memproduksi asam asetat dari berbagai macam bahan makanan yang beralkohol. Bahan makanan yang biasa digunakan yaitu sari buah apel, anggur, biji-bijian fermentasi, malt, beras, atau bubur kentang. Secara umum reaksi kimia yang terjadi oleh mikroorganisme ini yaitu:



Dari proses fermentasi asam cuka, energi yang dihasilkan 5 kali lebih besar dari energi yang dihasilkan oleh fermentasi alkohol secara anaerob (Syifa, 2012).

Dalam pengolahan *vinegar*, terjadi 2 kali fermentasi yaitu :

1. Fermentasi pembentukan alkohol dengan yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

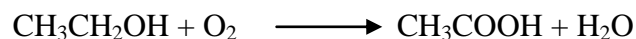
Pada fermentasi ini terjadi perombakan glukosa menjadi alkohol dan gas CO₂ dengan reaksi sebagai berikut :



Reaksi yang terjadi pada fermentasi ini yaitu secara anaerob. Etanol adalah hasil utama fermentasi tersebut, disamping asam laktat, asetaldehid, gliserol dan asam asetat. Etanol yang diperoleh maksimal hanya sekitar 15%. Untuk memperoleh etanol 95% dilakukan proses destilasi. Etanol digunakan untuk minuman, zat pembunuh kuman, bahan bakar dan pelarut.

2. Fermentasi perubahan alkohol menjadi asam asetat oleh *Acetobacter aceti*.

Reaksi pembentukan asam asetat dituliskan sebagai berikut :

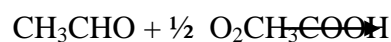


Reaksi yang terjadi adalah reaksi aerob. Pada fermentasi tahap ke-2 ini terjadi pembentukan asam asetat, dimana terjadi perubahan etanol menjadi asam asetat melalui pembentukan asetaldehid dengan reaksi sebagai berikut :



Etanol

Asetaldehid



Asetaldehid

Asam asetat

Asam asetat berasal dari proses fermentasi dengan memanfaatkan bakteri atau ragi. Berikut adalah macam-macam cuka berdasarkan metode fermentasinya :

1. *Slow fermentation*

Slow fermentation merupakan proses pembuatan cuka dengan metode tradisional. Pada metode ini fermentasi biasanya dilakukan pada tong-tong lalu

difermentasi dalam waktu yang cukup lama, yaitu minimal 3 bulan, bahkan sampai bertahun-tahun dengan suhu 21-29°C. Bahan yang akan dibuat dihancurkan terlebih dahulu lalu difermentasi dalam tong. Flavor dari asam asetat dengan metode *slow fermentation* lebih bagus dan enak. Kelebihan pada metode ini adalah prosesnya sangat sederhana, sedangkan kekurangan dari metode ini adalah prosesnya relatif lama dan jatuhnya lapisan tipis agar-agar dari bakteri *vinegar* akan memperlambat proses asetifikasi.

2. *Fast Fermentation*

Fast fermentation biasanya dikenal sebagai fermentasi modern. Pada proses pembuatannya menggunakan kultur murni. Waktu fermentasinya lebih cepat yaitu dalam hitungan hari. Bakteri asam asetat akan berhenti memproduksi asam asetat jika kadar asam asetat telah mencapai 12 hingga 14%. Kelebihan pada metode ini adalah biaya proses relatif rendah, sederhana, mudah dalam mengontrol, konsentrasi produk asam asetat besar, tangki proses membutuhkan sedikit tempat peletakannya dan penguapannya sedikit. Sedangkan kelemahan dari metode ini adalah waktu tinggal terlalu lama bila dibandingkan dengan metoda perendaman dan pembersihan tangki cukup sulit. Flavornya lebih spesifik asam asetat karena mikroorganisme yang digunakannya hanya mikroorganisme tertentu saja (Rizka, 2013).

2.4 Bakteri yang Digunakan Dalam Pembuatan *Vinegar*

Dalam pengolahan *vinegar*, terjadi 2 kali fermentasi yaitu: fermentasi pembentukan alkohol dengan yeast *Saccharomyces cerevisiae* dan fermentasi perubahan alkohol menjadi asam asetat dan air dengan bakteri *Acetobacter aceti*.

2.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae merupakan khamir sejati yang tergolong eukariot yang secara morfologi hanya membentuk blastospora berbentuk bulat lonjong, silindris, oval atau bulat telur yang dipengaruhi oleh adanya strainnya. Khamir dapat berkembang biak dalam gula sederhana, seperti glukosa maupun gula kompleks disakarida yaitu sukrosa (Marx, 1991).

Selain itu untuk menunjang kebutuhan hidup diperlukan oksigen, karbohidrat dan nitrogen. Pada uji fermentasi, gula-gula mempunyai reaksi positif pada gula dekstrosa, galaktosa, sukrosa, maltose, rafinosa, trehalosa dan negatif pada gula laktosa (Marx, 1991).

Saccharomyces cerevisiae mempunyai beberapa enzim yang mempunyai fungsi penting yaitu intervas, peptidase dan zimase. *Saccharomyces cerevisiae* adalah salah satu bakteri yang digunakan dalam proses pembuatan *vinegar*, dimana bakteri ini berperan mengubah glukosa menjadi alkohol. *Saccharomyces cerevisiae* dapat bertunas sehingga membentuk rantai sel yang menyerupai hifa atau hifa semu. *Saccharomyces cerevisiae* dapat berkembang biak secara seksual dan aseksual. Perkembangbiakan aseksual diawali dengan menonjolnya dinding sel ke luar membentuk tunas kecil. Tonjolan membesar dan sitoplasma mengalir ke dalamnya sehingga sel menyempit pada bagian dasarnya. Selanjutnya nukleus dalam sel induk membelah secara mitosis dan satu anak inti bergerak ke dalam tunas tadi. Sel anak kemudian memisahkan diri dari induknya atau membentuk tunas lagi hingga membentuk koloni. Dalam keadaan optimum satu sel dapat membentuk koloni dengan 20 kuncup. Perkembangbiakan

seksual terjadi jika keadaan lingkungan tidak menguntungkan. Pada prosesnya, sel *Saccharomyces cerevisiae* berfungsi sebagai askus. Nukleusnya yang diploid ($2n$) membelah secara meiosis, membentuk empat sel haploid (n). Inti-inti haploid tersebut akan dilindungi oleh dinding sel sehingga membentuk askospora haploid (n). Dengan perlindungan ini askospora lebih tahan terhadap lingkungan buruk. Selanjutnya, empat askospora akan tumbuh dan menekan dinding askus hingga pecah, akhirnya spora menyebar. Jika spora jatuh pada tempat yang sesuai, sel-sel baru akan tumbuh membentuk tunas, sebagaimana terjadi pada fase aseksual. Dengan demikian *Saccharomyces cerevisiae* mengalami fase diploid ($2n$) dan fase haploid (n) dalam daur hidupnya.

2.4.2 *Acetobacter aceti*

Acetobacter adalah bakteri yang digunakan untuk membuat cuka. Dalam pembuatan cuka, gel seperti membran selalu ditemukan pada permukaan larutan. Material ini berkembang menjadi selulosa. Selulosa ini difermentasi oleh bakteri yang dinamakan selulosa bakteri (Philip G.O dan William P.A., 2000).

Acetobacter aceti adalah bakteri yang digunakan dalam fermentasi tahap ke-2 pada proses pembuatan *vinegar*, dimana bakteri ini berfungsi untuk merubah alkohol menjadi asam asetat. *Acetobacter* adalah sebuah genus bakteri asam asetat yang ditandai dengan kemampuan untuk mengubah etanol menjadi asam asetat dengan adanya oksigen. Ada beberapa spesies dalam genus ini, tetapi semua *Acetobacter* dikenal dengan kemampuan yang khas. *Acetobacter* ini sangat penting secara komersial, karena dapat digunakan dalam produksi cuka (dengan sengaja

mengubah etanol menjadi asam asetat), dapat digunakan untuk mengasamkan bir selama periode pematangan yang panjang dalam produksi tradisional. Ketika *acetobacter* membentuk asam asetat yang cukup dari etanol, kalsium karbonat di sekitar koloni larut dan membentuk zona bening yang sangat berbeda. Fermentasi ini biasa dilakukan oleh bakteri asam cuka (*acetobacter*) dengan substrat etanol (Waluyo, 1984).

Acetobacter aceti memiliki ciri-ciri bentuk sel bulat memanjang, respirasi aerobik, dapat tumbuh sampai suhu 30°C, serta mampu menghasilkan asam asetat. *Acetobacter aceti* merupakan gram negatif untuk kultur yang masih muda, gram positif untuk kultur yang sudah tua, obligat aerobik, membentuk batang dalam medium asam, sedangkan dalam medium alkali berbentuk oval, bersifat non mortal dan tidak membentuk spora, tidak mampu mencairkan gelatin, tidak memproduksi H₂S, tidak mereduksi nitrat dan *thermal death point* pada suhu 65-70°C. Biasanya ukuran 0,6-0,8 x 1,0-4,0 µm. *Acetobacter* terdapat di beberapa buah seperti anggur dan buah-buah yang telah membusuk. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa genus *Acetobacter* mampu diisolasi dari suspensi campuran berupa buah *cherry*, apel, kurma, *palm*, kelapa, beberapa bunga dan masih berpotensi pada bahan-bahan yang lain (Waluyo, 1984).

Acetobacter adalah sebuah genus bakteri penghasil asam asetat, ditandai dengan kemampuannya mengubah etanol (alkohol) menjadi asam asetat (asam cuka) dengan bantuan udara. Ada beberapa bakteri dari golongan lain yang mampu menghasilkan asam asetat dalam kondisi tertentu, namun semua anggota genus *Acetobacter* dikenal memiliki kemampuan ini. *Acetobacter* dikenali dengan

mudah dengan pertumbuhankoloninya di medium yang mengandung 7% etanol dan ditambahkan kalsium karbonat secukupnya untuk memburamkan medium sebagian. Ketika koloni tersebut membentuk asam asetat yang cukup, kalsium karbonat kemudian melarut sehingga terbentuk daerah bening yang jelas pada medium (Lay, 1994).

Pada fermentasi alkohol diperlukan mikroba yang dapat memecah gula, sehingga proses fermentasi dapat berlangsung. Setelah alkohol terbentuk, alkohol tersebut akan dioksidasi oleh *Acetobacter* dan menjadi asam asetat. Proses perubahan alkohol menjadi asam asetat disebut sebagai proses asetifikasi (Salle, 1961). Konsentrasi gula pada bahan sangat berpengaruh terhadap kadar hasil fermentasi dari gula tersebut yaitu kadar alkohol dan kadar asam organik yang terbentuk. Kadar alkohol yang terbentuk selama proses fermentasi gula jika kadarnya terlalu banyak (lebih dari 14%-15%) justru akan menghambat pertumbuhan bakteri dan kadar asam yang terbentuk akan mempengaruhi derajat keasaman dari larutan medium, sedangkan proses fermentasi asam asetat harus dalam pH yang sesuai (Frazier, 1988).

Acetobacter mengoksidasi asam asetat lebih lanjut menjadi O_2 dan H_2O . Bakteri asam asetat mempunyai kemampuan membentuk asam dari alkohol secara oksidasi diekspresikan ke dalam medium. Bakteri ini termasuk bakteri gram negatif yang bergerak lambat dengan flagella peritrik, memiliki toleransi terhadap asam yang tinggi dan aktivitas peptolitik yang rendah. Fermentasi asam asetat dilakukan oleh bakteri asam asetat terhadap larutan yang mengandung alkohol. Bakteri asam asetat tersebut termasuk dalam famili *Pseudomonadaceae*

yang memiliki ciri-ciri sebagai berikut sel berbentuk batang pendek atau bola, bakteri gram negatif, sel bergerak dan tidak bergerak, tidak mempunyai endospora, tidak bersifat patogen, bersifat aerob, energi diperoleh dari oksidasi etanol menjadi asam asetat, mampu hidup dalam air, padatan, daun, buah, dan lain-lain. Bakteri asam asetat digolongkan menjadi peroksidan jika mampu menumpuk asetat (Frazier, 1988).

2.5 Asam Asetat

Asam asetat merupakan salah satu produk industri yang banyak dibutuhkan di Indonesia. Asam asetat dapat dibuat dari substrat yang mengandung alkohol, yang diperoleh dari berbagai macam bahan seperti buah buahan, kulit nanas, *pulp* kopi, dan air kelapa. Hasil dari fermentasi asam asetat sering disebut sebagai *vinegar* yang berarti *sour wine*. *Vinegar* berasal dari bahasa Perancis, *vindiger* (vin=wine, digger=sour). Pada saat ini cuka atau *vinegar* dibuat dari bahan kaya gula seperti buah anggur apel, nira kelapa, *malt*, gula sendiri seperti sukrosa dan glukosa, dimana pembuatannya melibatkan proses fermentasi alkohol dan fermentasi asetat secara berimbang. Komposisi *vinegar* tergantung dari bahan baku, proses fermentasi menjadi alkohol dan fermentasi alkohol menjadi asam cuka, pengeraman, serta penyimpanan. Asam cuka mengandung 4 gram *vinegar* dalam 100 ml, pada suhu 20⁰C. Dalam proses fermentasi asetat memerlukan pembiakan murni *Acetobacter* yang disebut juga dengan *starter*. *Starter* adalah populasi mikroba dalam jumlah dan kondisi fisiologis yang siap diinokulasikan dengan biakan murni. Starter baru dapat digunakan 8 hari setelah diinokulasikan

dengan biakan murni. Pemakaian starter tidak diizinkan terlalu banyak karena tidak ekonomis.

Asam asetat dapat dihasilkan dari senyawa C_2H_5OH (etanol) atau buah-buahan yang mengandung senyawa tersebut melalui proses oksidasi biologis yang menggunakan mikroorganisme. Etanol dioksidasikan menjadi asetaldehid dan air. Asetaldehid dihidrasi yang kemudian dioksidasi menjadi asam asetat dan air. Mekanisme pembentukan asam asetat yaitu bakteri asam asetat dapat menggunakan oksigen sebagai penerima elektron, urutan reaksi oksidasi biologis mengikuti pemindahan hidrogen dari substrat etanol. Enzim etanol dehidrogenase dapat melakukan reaksi ini karena mempunyai sistem sitokrom yang menjadi kofaktornya. Bakteri asam asetat, khususnya dari genus *Acetobacter* adalah mikroorganisme aerobik yang mempunyai enzim intraselular yang berhubungan dengan sistem bioksidasi mempergunakan sitokrom sebagai katalisatornya.

1. Sifat Fisika

Sifat fisika dari asam asetat adalah berbentuk cairan jernih, tidak berwarna, berbau menyengat, pH asam, memiliki rasa masam yang sangat tajam, mempunyai titik beku $16,6^{\circ}C$, titik didih $118,1^{\circ}C$ dan larut dalam air, alkohol dan eter. Asam asetat dibuat dengan fermentasi alkohol oleh bakteri *Acetobacter aceti*. Asam asetat mempunyai rumus molekul CH_3COOH dengan bobot molekul 60,05 (Depkes RI, 1995).

2. Sifat Kimia

Sifat kimia yang dimiliki asam asetat adalah menguap di udara terbuka, mudah terbakar, dan dapat menyebabkan korosi pada logam. Asam asetat jika

direaksikan dengan karbonat akan menghasilkan karbondioksida. Penetapan kadar asam asetatnya biasanya menggunakan basa natrium hidroksida, dimana 1 ml natrium hidroksida 1N setara dengan 60,05 mg CH_3COOH (Depkes RI, 1995).

Asam asetat digunakan untuk keperluan rumah tangga, industri dan kesehatan, seperti sebagai bahan penyedap rasa, bahan pengawet untuk beberapa jenis makanan dan merupakan pengawet makanan secara tradisional, pembuatan obat-obatan (aspirin), bahan dasar pembuatan anhidrida asam asetat yang sangat penting yang diperlukan untuk asetilasi, sebagai bahan dasar untuk pembuatan banyak persenyawaan lain (amil asetat, asetil klorida,dll), dibidang industri karet (menggumpalkan karet) dan 0,3% asam asetat dapat mencegah pertumbuhan kapang penghasil mikotoksin (Tjokroadikoesoemo, 1993).

III METODOLOGI PENELITIAN

Bab ini menguraikan mengenai: (1) Bahan dan Alat, (2) Metode Penelitian, dan (3) Prosedur Penelitian.

3.1 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.1.1 Bahan yang Digunakan

Bahan yang digunakan dalam proses pengolahan murbei adalah buah murbei yang didapat dari daerah Cibodas, Lembang, gula, air, *Sacharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti*.

Bahan yang digunakan dalam analisis kimia dalam menentukan kadar asamasetat *vinegar* adalah NaOH, pp, dan aquades, sedangkan bahan yang digunakan dalam analisis kadar alkohol yaitu aquades.

3.1.2 Alat yang Digunakan

Alat yang digunakan dalam proses pengolahan murbei adalah baskom untuk mencuci buah murbei, panci berbahan *stainless steel* untuk merebus buah murbei, gelas ukur, toples, saringan, sendok, *blander* dan timbangan.

Alat yang digunakan dalam analisis kimia adalah labu erlenmeyer, alat destilasi, kompor gas, pipet, gelas ukur dan piknometer untuk analisis kadar alkohol. Labu erlenmeyer, pipet tetes, buret, statif dan klem untuk analisis kadar asamasetat.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan yang dilakukan yaitu mencari konsentrasi gula terbaik dalam pembuatan *vinegar* murbei, dimana konsentrasi gula yang

digunakan terdiri dari beberapa konsentrasi, diantaranya yaitu 10%, 15%, 20%, dan 25%. Konsentrasi gula yang dipilih yaitu konsentrasi gula yang dapat menghasilkan kadar asam asetat terbaik yang dilakukan dengan metode titrasi alkalimetri. Konsentrasi gula yang telah terpilih akan digunakan selanjutnya pada penelitian utama.

3.2.2 Penelitian Utama

Penelitian utama yang dilakukan yaitu lanjutan dari penelitian pendahuluan, dimana konsentrasi gula yang telah terpilih di penelitian pendahuluan akan digunakan dalam penelitian utama dalam menentukan pengaruh konsentrasi inokulum dan lama fermentasi terhadap karakteristik *vinegar* murbei.

1. Rancangan Perlakuan

Rancangan perlakuan pada penelitian ini terdiri dari 2 faktor yaitu jenis lama fermentasi (F) dan konsentrasi inokulum *Acetobacter aceti* (K) dengan 3 taraf perlakuan, yaitu:

- a. Faktor Konsentrasi Inokulum *Acetobacter aceti* (K), sebagai anak petak yang terdiri dari 3 taraf yaitu :

$$k_1 = 7\%$$

$$k_2 = 9\%$$

$$k_3 = 11\%$$

- b. Faktor lama fermentasi (F), sebagai petak utama yang terdiri dari 3 taraf yaitu :

$$f_1 = 7 \text{ hari}$$

$$f_2 = 10 \text{ hari}$$

$$f_3 = 13 \text{ hari}$$

2. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pola faktorial 3 x 3 dengan metode Rancangan Petak Terbagi (RPT) dengan 3 kali ulangan.

Membuktikan adanya perbedaan pengaruh perlakuan terhadap respon variabel atau parameter yang diamati, maka dilakukan analisa data sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + K_k + K_i + \delta_{ik} + F_j + KF_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dimana :

Y_{ijk} : Nilai pengamatan (respon) pada kelompok ke-k yang memperoleh taraf ke-i dari faktor F dan taraf ke-j dari faktor K

μ : Nilai rata-rata sebenarnya

F_j : Pengaruh lama fermentasi dari taraf ke-j faktor F

K_i : Pengaruh konsentrasi inokulum *Acetobacter aceti* dari taraf ke-i faktor K

δ_{ijk} : Pengaruh galat yang muncul pada taraf ke-i dari faktor F dalam kelompok ke-k, sering disebut galat petak utama (galat a).

K_k : Pengaruh konsentrasi inokulum dari taraf lama fermentasi ke-j

$(FK)_{ij}$: Pengaruh interaksi taraf ke-i faktor K dan taraf ke-j faktor F

ϵ_{ijk} : Pengaruh galat pada kelompok ke-k yang memperoleh taraf ke-i faktor K dan taraf ke-j faktor F, disebut sebagai galat anak petak (galat b).

Model rancangan pola faktorial 3 x 3 dengan Rancangan Petak Terbagi (RPT) dapat dilihat pada Tabel 1. dibawah ini :

Tabel 1. Model Rancangan Percobaan Pola Faktorial 3x3 dengan Rancangan Petak Terbagi (RPT) dengan 3 kali ulangan.

Lama Fermentasi (F)	Kelompok	Konsentrasi Inokulum <i>Acetobacter aceti</i> (K)		
		5%	7%	9%
f ₁ (14 hari)	1	f ₁ k ₁	f ₁ k ₂	f ₁ k ₃
	2	f ₁ k ₁	f ₁ k ₂	f ₁ k ₃
	3	f ₁ k ₁	f ₁ k ₂	f ₁ k ₃
Sub Total		$\sum f_1 k_1$	$\sum f_1 k_2$	$\sum f_1 k_3$
Rata-rata				
f ₂ (16 hari)	1	f ₂ k ₁	f ₂ k ₂	f ₂ k ₃
	2	f ₂ k ₁	f ₂ k ₂	f ₂ k ₃
	3	f ₂ k ₁	f ₂ k ₂	f ₂ k ₃
Sub Total		$\sum f_2 k_1$	$\sum f_2 k_2$	$\sum f_2 k_3$
Rata-rata				
f ₃ (18 hari)	1	f ₃ k ₁	f ₃ k ₂	f ₃ k ₃
	2	f ₃ k ₁	f ₃ k ₂	f ₃ k ₃
	3	f ₃ k ₁	f ₃ k ₂	f ₃ k ₃
Sub Total		$\sum f_3 k_1$	$\sum f_3 k_2$	$\sum f_3 k_3$
Rata-rata				
Total		$\sum f_1 k_1 + f_2 k_1 + f_3 k_1$	$\sum f_1 k_2 + f_2 k_2 + f_3 k_2$	$\sum f_1 k_3 + f_2 k_3 + f_3 k_3$
Rata-rata				
Kelompok		1	2	3
Total				

Sumber : Gaspersz, (2006)

Berdasarkan rancangan faktorial diatas dapat dibuat tabel angka acak dalam layout percobaan faktorial 3 x 3 dengan metode Rancangan Petak Terbagi (RPT) pada Tabel 2. dibawah ini :

Tabel 2. Layout Rancangan Petak Terbagi Pola Faktorial 3 x 3

Kelompok Ulangan Pertama		
f ₃ k ₁	f ₂ k ₁	f ₁ k ₂
f ₃ k ₃	f ₂ k ₂	f ₁ k ₁
f ₃ k ₂	f ₂ k ₃	f ₁ k ₃

Kelompok Ulangan Kedua		
f ₁ k ₁	f ₃ k ₃	f ₂ k ₃
f ₁ k ₂	f ₃ k ₂	f ₂ k ₁
f ₁ k ₃	f ₃ k ₁	f ₂ k ₂

Kelompok Ulangan Ketiga		
f_3k_1	f_2k_3	f_1k_1
f_3k_2	f_2k_1	f_1k_3
f_3k_3	f_2k_2	f_1k_2

Sumber : Gaspersz, (2006).

3. Rancangan Analisis

Berdasarkan rancangan diatas, maka dapat dibuat analisis variansi (ANAVA) untuk Rancangan Petak Terbagi (RPT) dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Sidik Ragam (ANAVA) Rancangan Petak Terbagi (RPT)

Sumber Keragaman	Derajat Bebas (db)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F. Hitung	F. Tabel 5%
<u>Petak Utama (mainplot)</u>					
Kelompok	r-1	JKK	JKK/(r-1)	- KT(F)/KTG(f)	
Faktor F	k-1	JK (K)	JK(F)/(f-1)		
Galat a	(k-1)(r-1)	JKG(f)	JKG(f)/(f-1)(r-1)		
<u>Anak Petak (Subplot)</u>					
Faktor K	f-1	JK (B)	JK(K)/(f-1)	KT(K)/KTG(k)	
Interaksi KF	(k-1)(f-1)	JK (KF)	JK(KF)/(f-1)(k-1)	KT(KF)/KTG(k)	
Galat b	k(r-1)(f-1)	JKG(k)	JKG(k)/k(r-1)(k-1)		
Total	kfr-1	JKT	-	-	-

Sumber : Gaspersz, (2006).

Kesimpulan :

- 1). Jika $F_{hitung} > F_{tabel}$ pada taraf 5%, maka perlakuan konsentrasi inokulum dan lama fermentasi berpengaruh terhadap karakteristik *vinegar* murbei. Demikian hipotesis diterima, kemudian akan dilanjutkan dengan uji lanjut LSD (*Least Significance Different*) untuk mengetahui perbedaan sampel.
- 2). Jika $F_{hitung} \leq F_{tabel}$ pada taraf 5%, maka perlakuan konsentrasi inokulum dan lama fermentasi tidak berpengaruh terhadap karakteristik *vinegar* murbei. Demikian hipotesis penelitian ditolak (Gaspersz, 2006).

4. Rancangan Respon

Pada penelitian ini respon yang dilakukan adalah respon kimia dan organoleptik, dimana respon kimia yang dilakukan yaitu menentukan kandungan asam asetat dan kandungan alkohol terhadap *vinegar* murbei. Analisis kandungan asam asetat dilakukan dengan menggunakan metode titrasi alkalimetri, sedangkan analisis kandungan alkohol dilakukan dengan metode destilasi.

Respon organoleptik yang dilakukan yaitu menguji warna, aroma, dan rasa dengan menggunakan metode Uji Hedonik sehingga dapat diketahui apakah produk *vinegar* murbei ini disukai atau tidak disukai oleh konsumen.

3.3 Deskripsi Percobaan

3.3.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dalam proses pengolahan *vinegar* ini adalah menentukan konsentrasi gula terbaik dalam pembuatan *vinegar* agar didapatkan kadar asam asetat terbaik. Untuk mengetahui konsentrasi gula terbaik dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Sortasi dan Trimming

Sortasi murbei dilakukan untuk memisahkan bahan baku dari adanya pengotor, dimana sortasi ini dilakukan berdasarkan karakteristik fisiknya, seperti ukuran, bentuk dan warna. Trimming dilakukan dengan memisahkan buah murbei dari tangkainya.

2. Pencucian

Pencucian buah murbei dilakukan dengan menggunakan air mengalir. Pencucian ini dilakukan untuk menghilangkan residu pestisida yang menempel dan mengering pada buah.

3. Perebusan

Perebusan buah murbei dilakukan selama 45 menit dalam panci. Perebusan ini dilakukan untuk melunakkan atau melayukan jaringan bahan, menonaktifkan enzim dalam bahan, serta menurunkan jumlah mikroba yang hidup pada buah murbei.

4. Tempering

Sari buah yang telah dilakukan penyaringan kemudian didinginkan hingga suhunya mencapai $\pm 27^{\circ}\text{C}$ dengan cara didiamkan di suhu ruang.

5. Penghancuran

Penghancuran dilakukan dengan menggunakan *blander*, dimana penghancuran buah murbei ini dilakukan untuk mendapatkan bubur buah murbei.

6. PenyaringanI

Penyaringan dilakukan untuk memperoleh sari buah yang jernih, karena sari buah yang diperoleh biasanya masih mengandung partikel padat, sehingga perlu dilakukan penyaringan agar mendapatkan sari buah yang jernih.

7. Pencampuran

Pencampuran dilakukan pada saat buah murbei yang telah direbus tadi dilakukan penghancuran. Penambahan gula ini berfungsi untuk memberi rasa, sebagai pengawet, serta sebagai media untuk mikroorganisme tumbuh.

8. Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter, dimana pH yang diukur terhadap sari buah murbei yaitu 4,0.

9. Fermentasi

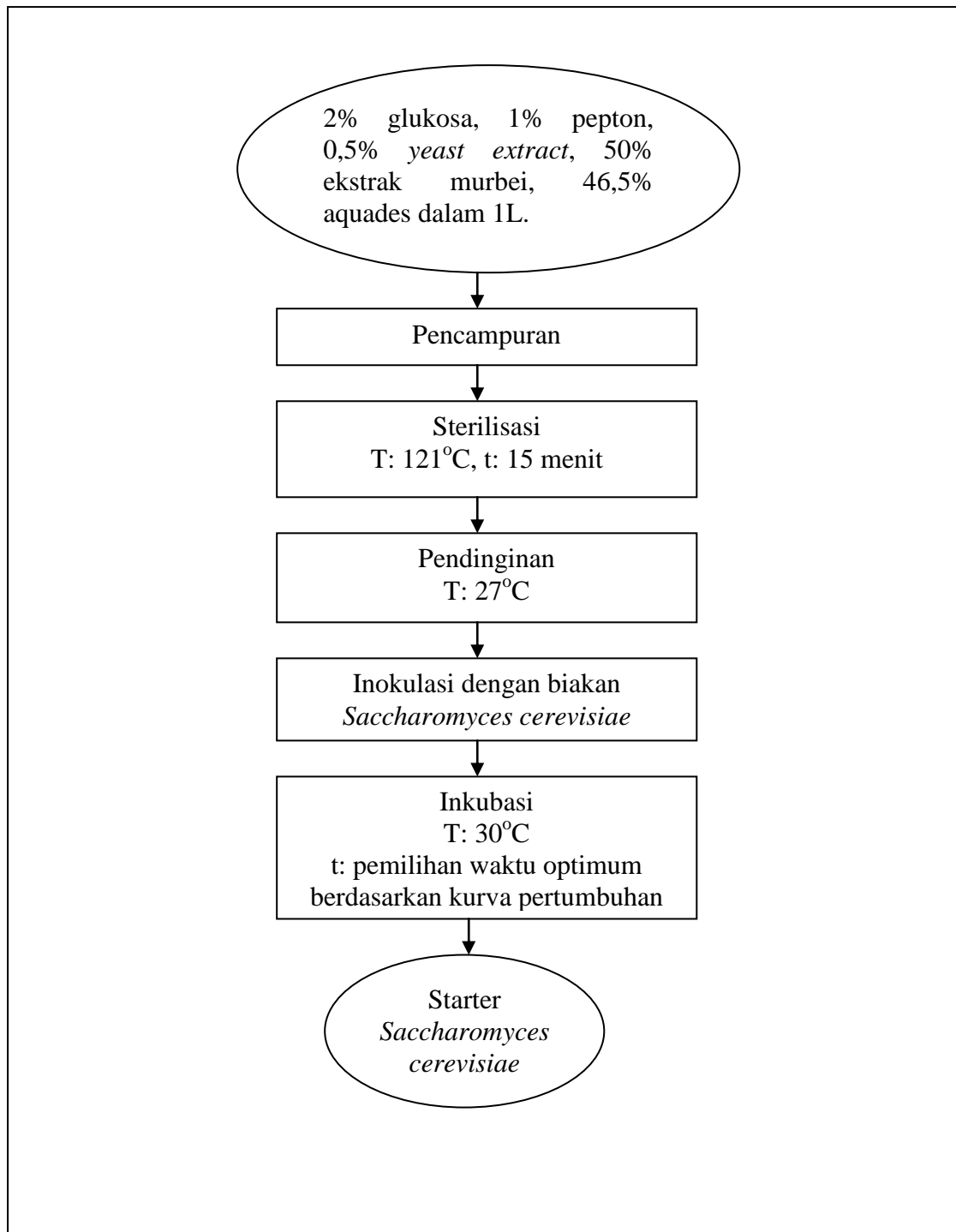
Fermentasi dilakukan dengan bantuan *Saccharomyces cerevisiae* dengan konsentrasi 5% dan *Acetobacter aceti* dengan konsentrasi 7% secara anaerob fakultatif, dimana dalam fermentasi ini terjadi proses perubahan gula menjadi alkohol oleh *Saccharomyces cerevisiae* serta terjadi proses perombakan alkohol menjadi asam asetat dengan bantuan *Acetobacter aceti*. Fermentasi ini dilakukan pada suhu 30°C dalam inkubator dengan bantuan *shaker* untuk proses aerasi.

10. Penyaringan II

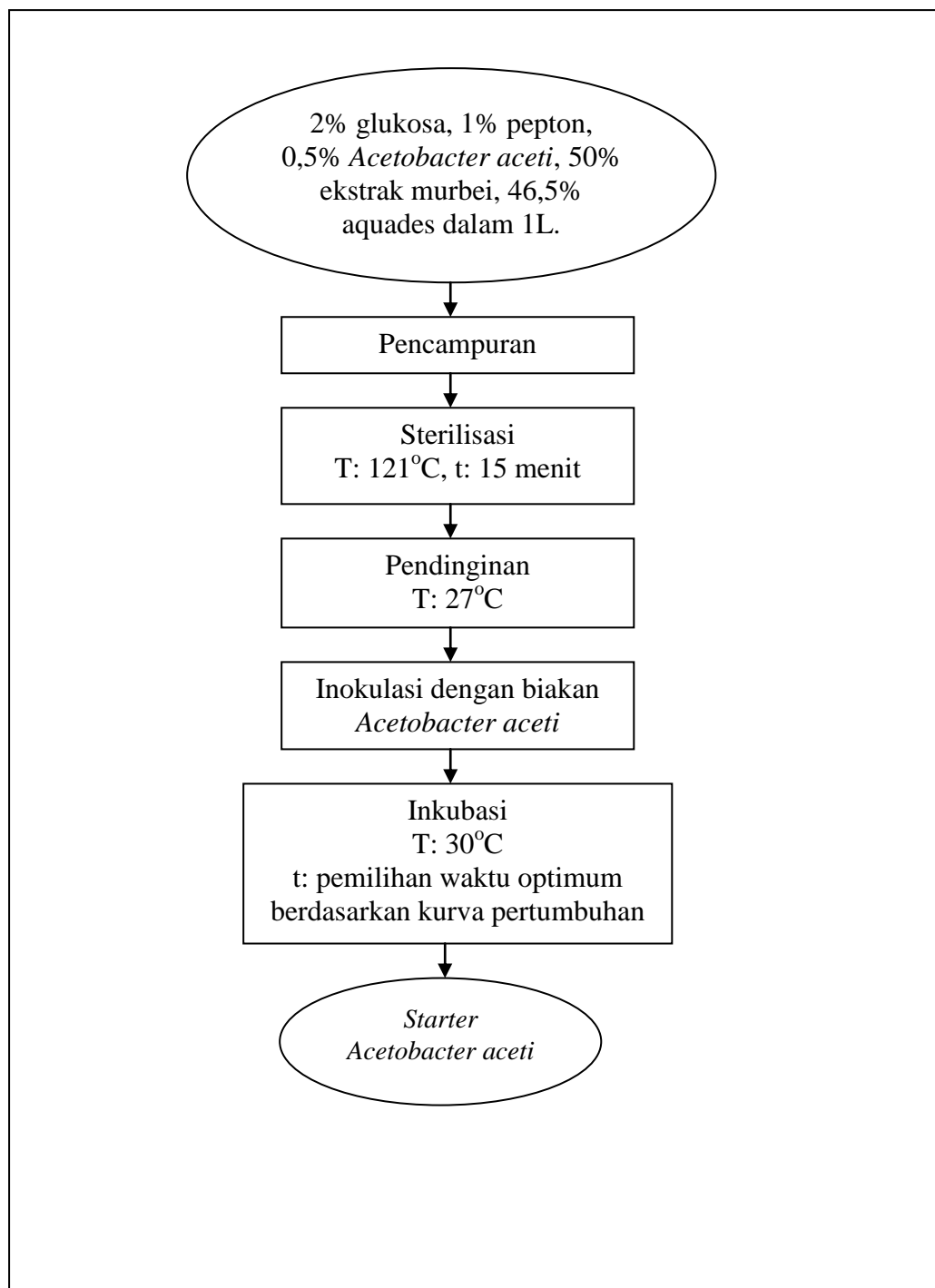
Penyaringan II dilakukan untuk memperoleh sari buah yang jernih, karena sari buah yang diperoleh dari fermentasi ini biasanya mengandung endapan sisa fermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae*, sehingga perlu dilakukan penyaringan agar mendapatkan sari buah yang jernih.

11. Analisis Kadar Asam Asetat

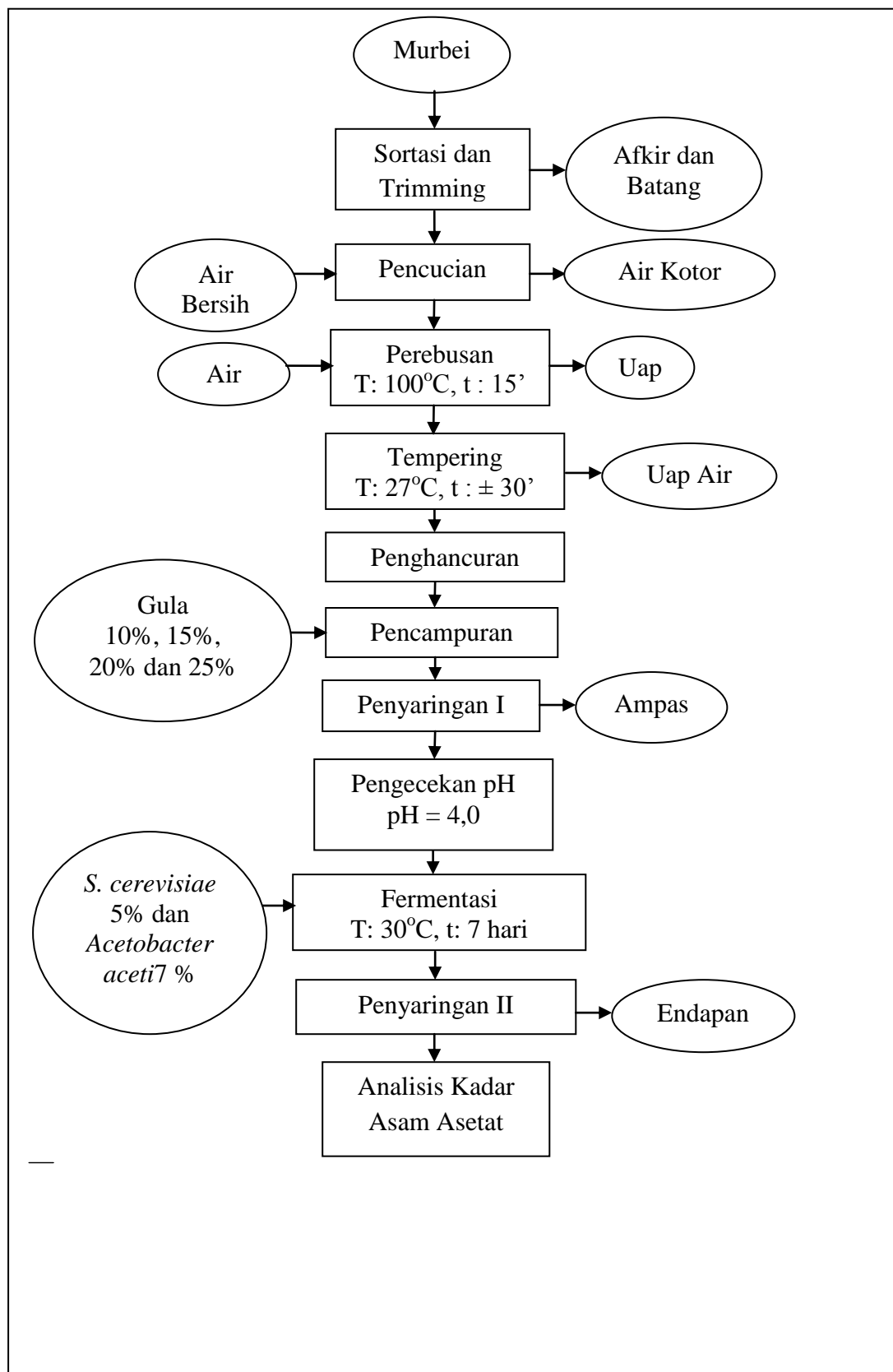
Analisis kadar asam asetat yang dilakukan yaitu dengan metode titrasi dengan NaOH. Dimana kadar asam asetat yang dihasilkan minimal 4 gram/100 ml.



Gambar 1. Diagram Alir Proses Pembuatan Starter *Saccharomyces cerevisiae*



Gambar 2. Diagram Alir Proses Pembuatan Starter *Acetobacter aceti*



Gambar 3. Diagram Alir PenelitianPendahuluan

3.3.2 Prosedur Penelitian Utama

Dari penelitian pendahuluan diperoleh konsentrasi gula terbaik untuk selanjutnya digunakan dalam penelitian utama. Pada penelitian utama dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi inokulum (K) yaitu 7%, 9%, dan 11% serta lama fermentasi (F) yaitu, 7 hari, 10 hari, dan 13 hari terhadap karakteristik *vinegar* murbei. Prosedur yang dilakukan dalam penelitian utama, yaitu :

1. Sortasi dan Trimming

Sortasi murbei dilakukan untuk memisahkan bahan baku dari adanya pengotor, dimana sortasi ini dilakukan berdasarkan karakteristik fisiknya, seperti ukuran, bentuk dan warna. Trimming dilakukan dengan memisahkan buah murbei dari tangkainya.

2. Pencucian

Pencucian buah murbei dilakukan dengan menggunakan air mengalir. Pencucian ini dilakukan untuk menghilangkan residu pestisida yang menempel dan mengering pada buah.

3. Perebusan

Perebusan buah murbei dilakukan selama 45 menit dalam panci. Perebusan ini dilakukan untuk melunakkan atau melayukan jaringan bahan, menonaktifkan enzim dalam bahan, serta menurunkan jumlah mikroba yang hidup pada buah murbei.

4. Tempering

Sari buah yang telah dilakukan penyaringan kemudian didinginkan hingga suhunya mencapai $\pm 27^{\circ}\text{C}$ dengan cara didiamkan di suhu ruang.

5. Penghancuran

Penghancuran dilakukan dengan menggunakan blender, dimana penghancuran buah murbei ini dilakukan untuk mendapatkan bubur buah murbei.

6. Penyaringan

Penyaringan dilakukan untuk memperoleh sari buah yang jernih, karena sari buah yang diperoleh biasanya masih mengandung partikel padat, sehingga perlu dilakukan penyaringan agar mendapatkan sari buah yang jernih.

7. Pencampuran

Pencampuran dilakukan pada saat buah murbei yang telah direbus tadi dilakukan penghancuran. Penambahan gula ini berfungsi untuk memberi rasa, sebagai pengawet, serta sebagai media untuk mikroorganisme tumbuh.

8. Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter, dimana pH yang diukur terhadap sari buah murbei yaitu 4,0.

9. Fermentasi

Fermentasi dilakukan dengan bantuan *Saccharomyces cerevisiae* dengan konsentrasi 5% dan *Acetobacter aceti* dengan konsentrasi 7% secara anaerob fakultatif dimana dalam fermentasi ini terjadi proses perubahan gula menjadi alkohol oleh *Saccharomyces cerevisiae* serta terjadi proses perombakan alkohol

menjadi asam asetat dengan bantuan *Acetobacter aceti*. Fermentasi ini dilakukan pada suhu 30°C dalam inkubator dengan bantuan *shaker* untuk proses aerasi.

10. Penyaringan II

Penyaringan II dilakukan untuk memperoleh sari buah yang jernih, karena sari buah yang diperoleh dari fermentasi ini biasanya mengandung endapan sisa fermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae*, sehingga perlu dilakukan penyaringan agar mendapatkan sari buah yang jernih.

11. Analisis Kadar Asam Asetat dan Kadar Alkohol

Hasil penelitian utama ini dilanjutkan dengan analisis kimia dan uji organoleptik. Analisis kimia yang dilakukan yaitu dengan menguji kadar asam asetat dengan metode titrasi alkalimetri dan menguji kadar alkohol dengan metode destilasi. Dimana kadar asam asetat yang dihasilkan minimal 4%, serta kadar alkohol maksimalnya yaitu 10%.

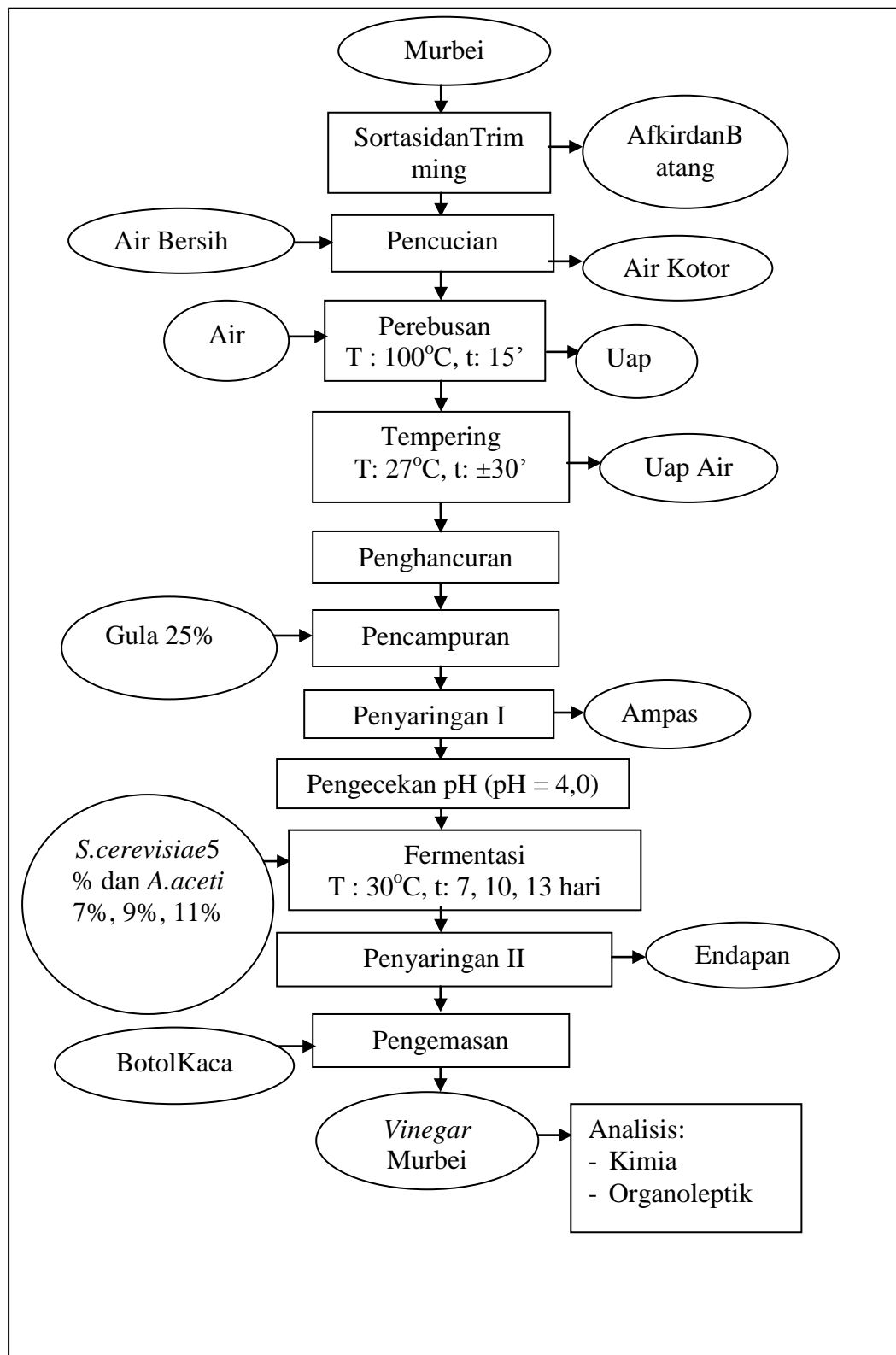
Uji Organoleptik yang dilakukan yaitu dengan menguji aroma, warna dan rasa dengan metode Uji Hedonik.

Tabel 4. Penilaian Uji Hedonik

Skala Hedonik	Skala Numerik
Sangat Suka	6
Suka	5
Agak Suka	4
Agak Tidak Suka	3
Tidak Suka	2
Sangat Tidak Suka	1

12. Pengemasan

Pengemas yang digunakan untuk produk *vinegar* ini yaitu botol kaca dengan diameter mulut botol yang kecil (seperti botol obat). Pengemasan dilakukan untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi terhadap produk.



Gambar 4. Diagram Alir Penelitian Utama

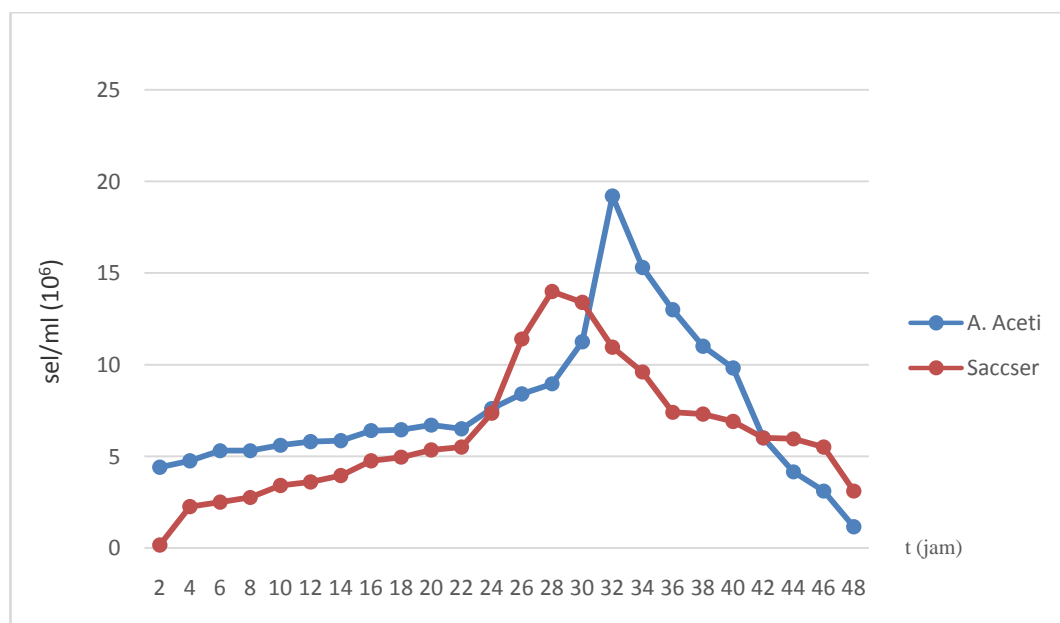
IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini menguraikan mengenai : (1) Hasil Penelitian Pendahuluan, dan (2) Hasil Penelitian Utama.

4.1 Hasil Penelitian Pendahuluan

4.1.1 Pertumbuhan Optimum *Saccharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti*

Sebelum dibuat starter *vinegar* murbei dilakukan terlebih dahulu pembuatan kurva pertumbuhan mikroba dalam suatu kultur dengan menggunakan metode *counting chamber*, dimana pengecekan jumlah sel dilakukan 2 jam sekali selama 48 jam. Pembuatan kurva tumbuh ini dilakukan untuk menentukan umur inokulum *Saccharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti* terbaik medium aktivasi sebelum dimasukkan ke dalam medium fermentasi. Pada gambar 5. dapat dilihat kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti*.



Gambar 5. Kurva Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti*.

Pada jam ke-28 pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* mencapai titik tertinggi. Sehingga waktu optimum yang terpilih untuk *Saccharomyces cerevisiae* tumbuh yaitu pada jam ke-28 dengan jumlah sel 14×10^6 sel/ml. Sedangkan pertumbuhan *Acetobacter aceti* dapat dilihat mencapai puncak pada jam ke-32 dengan jumlah sel $19,2 \times 10^6$ sel/ml yang selanjutnya akan digunakan untuk proses pembuatan starter *vinegar* murbei.

Penurunan jumlah sel mikroorganisme pada hari ke 2 terjadikarena *Saccharomyces cerevisiae* mengalami kematian. Hasil ini membuktikan teori Shuler (1989) yang menyatakan bahwa kultur yang diinokulasi akan melalui beberapa fase yaitu fase lag, fase log, fase stasioner dan fase kematian. Fase lag terjadi dengan cepat setelah inokulasi dan ini adalah masa penyesuaian sel dengan lingkungan. Fase lag ini terjadi pada jam ke- 18, 20, dan 22. Selama fase ini, jumlah massa meningkat sedikit tanpa peningkatan densitas sel. Pada fase log, sel sudah menyesuaikan diri dengan lingkungan baru. Setelah periode adaptasi, sel dapat mengganda dengan cepat dan jumlah sel serta densitas sel meningkat secara eksponensial. Pada fase stasioner, dimana pertumbuhan mikroorganisme terhambat. Hal ini disebabkan karena nutrisi mulai habis, sehingga tidak terjadi pembelahan oleh mikroorganisme. Fase pertumbuhan terlihat pada jam ke- 30, 32, 34, dan 36. Fase stasioner terjadi pada jam ke-38 dan mengalami fase kematian pada jam ke- 42.

Saccharomyces cerevisiae melakukan adaptasi (fase log) yang cukup singkat karena media untuk *starter* sama dengan media fermentasi dan sebelumnya telah dilakukan beberapa kali pemindahan *starter* dengan waktu

inkubasi masing-masing sekitar 20 jam sehingga usia sel relatif seragam. *Saccharomyces cerevisiae* dipanen pada jam ke-20 inkubasi (pertengahan fase log), dimana jumlah selnya sekitar 6×10^7 sel/ml. Diatas 30 jam, *Saccharomyces cerevisiae* telah memasuki fase stasioner. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Sen (1989), dimana pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* memasuki fase stasioner setelah 30 jam inkubasi. Menurut Ahmad Sarifuddin (2007), pertumbuhan terbaik *Acetobacter aceti* dalam pembuatan *vinegar* dari limbah cair Nata de Coco yaitu pada jam ke-12.

4.1.2 Penentuan Konsentrasi Gula

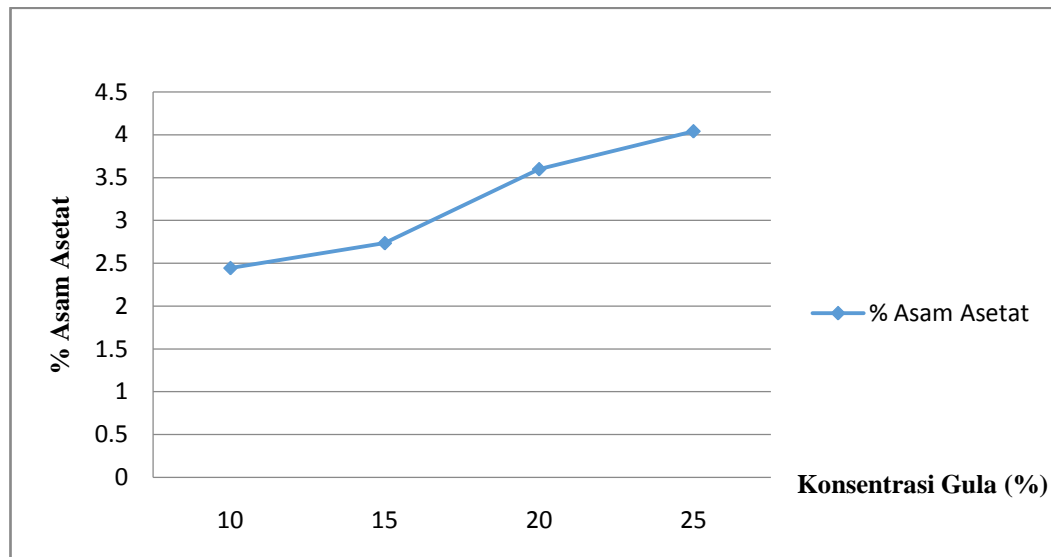
Penelitian pendahuluan yang dilakukan yaitu menentukan konsentrasi gula terbaik dalam pembuatan *vinegar* murbei. Dalam penelitian pendahuluan ini konsentrasi gula yang digunakan adalah 10%, 15%, 20%, dan 25%. Kadar asam asetat yang dihasilkan berdasarkan masing-masing konsentrasi gula dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil Penelitian Pendahuluan Konsentrasi Gula

Konsentrasi Gula	V NaOH (ml)	N NaOH	BM Cuka	% Asam Asetat
10%	3	0,144	60	2,4453
15%	3,8	0,144	60	2,7360
20%	4,5	0,144	60	3,6
25%	5,1	0,144	60	4,0426

Berdasarkan tabel 5 menunjukkan hasil bahwa semakin tinggi konsentrasi gula yang ditambahkan maka asam asetat yang dihasilkannya pun semakin tinggi. Seperti pada gambar 6 gula merupakan media untuk tumbuhnya mikroorganisme, sehingga semakin tinggi konsentrasi gula yang ditambahkan maka kinerja bakteri merombak gula menjadi alkohol pun semakin besar, maka alkohol yang

dihasilkannya tinggi dan semakin banyak alkohol yang dihasilkan maka asam asetat yang dihasilkan akan semakin banyak.



Gambar 6. Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Gula Dengan Kadar Asam Asetat

Kadar asam asetat yang dihasilkan pada konsentrasi gula 10% dengan konsentrasi inokulum *Saccharomyces cerevisiae* 5% dan *Acetobacter aceti* 7% adalah 4,075%, sedangkan menurut Rosdiana (2004), produksi *vinegar* melalui fermentasi bertahap pada nanas menghasilkan kadar asam asetat 5,75% pada konsentrasi inokulum *Saccharomyces cerevisiae* 5% dan *Acetobacter aceti* 15% dengan penambahan gula awal 10%. Menurut Ari Susilowaty (2001), penambahan sukrosa 5% dan 10% dengan konsentrasi inokulum 20% menghasilkan kadar asam asetat 3,744% dengan waktu fermentasi 72 jam.

Menurut Wood dan Lass (1985), asam asetat mencapai puncaknya setelah 5 sampai 6 hari kemudian akan mengalami penurunan. Asam asetat lebih banyak diproduksi pada konsentrasi gula yang tinggi. Jumlah asam asetat yang diproduksi selama fermentasi adalah kecil, biasanya lebih kecil dari 0,030 g/100 ml,

tergantung pada jenis fermentasi dan kondisi fermentasi. Jumlah asam asetat yang tinggi dapat terjadi akibat kegiatan bakteri sebelum, selama dan sesudah fermentasi. Bertambahnya asam asetat ini karena terjadinya oksidasi alkohol dan perombakan bakteri terhadap gula, asam sitrat, gliserol dan lainnya (Oxtoby, 2003).

4.2 Hasil Penelitian Utama

4.2.1 Kadar Asam Asetat

Berdasarkan pada lampiran 5 menunjukkan bahwa interaksi lama fermentasi (F) dan konsentrasi inokulum *Acetobacter aceti*(K) berpengaruh terhadap kadar asam asetat *vinegar* murbei. Berdasarkan pada tabel 6 menunjukan bahwa semakin tinggi konsentrasi *Acetobacter aceti* yang ditambahkan ke dalam *vinegar* murbei, maka semakin banyak asam asetat yang dihasilkan. Kinerja bakteri *Acetobacter aceti* untuk merombak alkohol menjadi asam mengalami penurunan kadar asam asetat pada hari ke-10 dan ke-13 yang disebabkan oleh laju pembentukan produk yang semakin tinggi, dimana produk yang dihasilkan dapat menghambat reaksi penguraian alkohol menjadi asam asetat karena waktu optimum bakteri *Acetobacter aceti* yaitu pada hari ke-7, sehingga mengalami penurunan di hari ke-10 dan ke-13. Semakin lama waktu fermentasi, kadar asam yang dihasilkan semakin kecil. Ini disebabkan karena bakteri *Acetobacter aceti* sudah tidak mampu menguraikan alkohol menjadi asam asetat secara maksimal.

Menurut Wood dan Lass (1985) asam asetat mencapai puncaknya setelah 5-6 hari kemudian akan mengalami penurunan.

Menurut Hardoyo (2007), waktu optimum proses asetifikasi yaitu 11 hari, dimana mengalami peningkatan kadar asam asetat pada hari ke-1 sampai hari ke-11 dengan kadar asam asetat 6% dan mengalami penurunan dihari ke-12. Ini disebabkan karena beberapa faktor seperti konsentrasi inokulum yang ditambahkan, bahan baku yang digunakan, dan suhu fermentasi.

Konsentrasi inokulum *Acetobacter acetijuga* sangat berperan penting terhadap berlangsungnya proses asetifikasi, dimana *Acetobacter aceti* ini berperan merombak alkohol menjadi asam asetat. Sehingga semakin banyak konsentrasi inokulum *Acetobacter aceti* yang ditambahkan maka alkohol yang dirombaknya pun akan semakin banyak sehingga menghasilkan asam asetat yang tinggi.

Menurut Pingkan (2003), penambahan inokulum 10% menghasilkan asam asetat tertinggi dibandingkan dengan penambahan konsentrasi inokulum 5% dan 15%. Hal ini disebabkan karena pada konsentrasi inokulum 5%, enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang berperan aktif dalam fermentasi jumlahnya tidak mencukupi untuk mengubah substrat yang ada, sehingga laju pertumbuhan asam asetat rendah. Sedangkan pada konsentrasi 15% laju pembentukan asam asetatnya pun rendah, karena terjadi kompetisi antara mikroorganisme dalam memanfaatkan nutrisi (substrat) yang ada.

Tabel 6. Pengaruh Konsentrasi Inokulum *Acetobacter acetidans* Lama Fermentasi Terhadap Kadar Asam Asetat *Vinegar* Murbei

Lama Fermentasi (F)	Konsentrasi Inokulum <i>A. aceti</i> (K)		
	k1 (7%)	k2 (9%)	k3 (11%)
f1 (7 hari)	3,50C a	3,94C b	4,22C c
f2 (10 hari)	3,23 B a	3,43 B b	3,78B c
f3 (13 hari)	2,97A a	2,96A a	3,95A a

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata dibaca secara horizontal dan angka yang diikuti oleh huruf besar yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata dibaca secara vertikal pada taraf 5%.

4.2.2 Kadar Alkohol

Berdasarkan pada lampiran 6 menunjukkan bahwa hasil kadar alkohol pada interaksi lama fermentasi (F) dan konsentrasi inokulum *Acetobacter aceti*(K) berpengaruh terhadap kadar alkohol *vinegar* murbei. Seperti pada tabel 7 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi inokulum *Acetobacter aceti* yang ditambahkan, maka kadar alkohol yang dihasilkan semakin sedikit, sehingga dapat dikatakan substrat beralkohol sebagian besar akan dioksidasi menjadi asam asetat oleh *Acetobacter aceti* dan yang lainnya menjadi alkohol sisa karena menurut Daulay (1992) disebutkan bahwa alkohol merupakan medium bakteri asam asetat untuk hidup dan mengubah alkohol menjadi asam asetat. Kadar alkohol pada *vinegar* murbei menurut SNI maksimal 10%, dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 7. Pengaruh Konsentrasi Inokulum *Acetobacter acetidan* Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol *Vinegar* Murbei

Lama Fermentasi (F)	Konsentrasi Inokulum <i>A. Aceti</i>		
	k1 (7%)	k2 (9%)	k3 (11%)
f1 (7 hari)	5,03 C c	4,47 C b	4,19 C a
f2 (10 hari)	3,81B c	3,46B b	3,18B a
f3 (13 hari)	3,46A c	3,09 A b	2,18 A a

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata dibaca secara horizontal dan angka yang diikuti oleh huruf besar yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata dibaca secara vertikal pada taraf 5%.

Lama fermentasi yang dilakukan seperti pada tabel 7 akan mempengaruhi kadar alkohol sisa yang dihasilkannya. Dimana penurunan kadar alkohol sisa fermentasi yang terjadi disebabkan karena alkohol digunakan oleh *Acetobacter acetisebagai* sumber energi untuk menghasilkan asam asetat serta CO₂.

Menurut Abdul Aziz (1995), kadar alkohol terbaik dihasilkan pada pH 4 awal, karena pada kondisi tersebut merupakan kondisi terbaik untuk *Saccharomyces cerevisiae* tumbuh. Dalam proses fermentasi glukosa dirombak untuk menghasilkan asam piruvat. Asam piruvat dalam kondisi anaerob akan mengalami penguraian oleh piruvat dekarboksilase menjadi asetaldehid, selanjutnya asetaldehid dirubah oleh alkohol dehidrogenase menjadi etanol dan karbondioksida, dimana bakteri *Acetobacter* akan merubah alkohol menjadi asetaldehid dan air, yang selanjutnya asetaldehid akan dirubah menjadi asam asetat (Madigan, 2002).

Tabel 8. Kualitas *Vinegar* Murbei Berdasarkan SNI

No	Kriteria	Satuan	Persyaratan	Kualitas <i>Vinegar</i> Murbei	Keterangan
1	Keadaan :				
	-Bentuk	-	Cairan Encer	Cairan Encer	Memenuhi
	-Bau	-	Khas asam asetat	Khas asam asetat	Memenuhi
2	Kadar asam asetat	% bb	Min 4	4,22	Memenuhi
3	NaCl	% bb	Min 30	-	-
4	Sisa Alkohol	% bb	Maks 10	4,19	Memenuhi
5	Padatan Terlarut	% bb	Maks 1,5	-	-
6	Total Gula	% bb	Min 15	-	-
7	Cemaran Logam :				
	-Timbal (Pb)	mg/kg	Maks 1	-	-
	-Tembaga (Cu)	mg/kg	Maks 5,0	-	-
	-Seng (Zn)	mg/kg	Maks 2,0	-	-
8	Cemaran Mikroba	Koloni/g	Maks 50	-	-
9	Cemaran Arsen	mg/kg	Maks 0,4	-	-

4.2.3 Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan metode Hedonik untuk mengetahui apakah produk fermentasi *vinegar* murbei dapat diterima dimasyarakat atau tidak sebagai penyedap rasa. Uji organoleptik produk “*vinegar* murbei” dilakukan terhadap 15 orang panelis yang memenuhi persyaratan untuk uji organoleptik dengan metode Hedonik.

4.2.3.1 Warna

Berdasarkan pada lampiran 7 menunjukkan tidak adanya pengaruh pada lama fermentasi, konsentrasi inokulum *Acetobacter aceti*, dan interaksi dari keduanya terhadap warna yang dihasilkan oleh *vinegar* murbei. Pada uji organoleptik atribut warna terhadap *vinegar* murbei menghasilkan warna merah kehitaman. Nilai rata-rata secara keseluruhan terhadap warna *vinegar* murbei menunjukkan nilai 4,2, dimana panelis memberikan respon agak suka terhadap warna *vinegar* murbei.

Menurut Kumalaningsih (2006), bahwa antosianin dalam media asam, tampak merah, saat pH meningkat menjadi lebih biru. Menurut Mudanifah (2007), produksi hasil fermentasi akan berpengaruh terhadap kestabilan antosianin, sebab antosianin bersifat lebih stabil pada pH 1 sampai 4. Antosianin dalam medium cair berada dalam keseimbangan antara empat bentuk utama antosianin yang masing-masing berbeda struktur dan penampakan warnanya pada larutan dan sangat tergantung pada pH. Bentuk kation (ion flavilium) yang berwarna merah adalah bentuk yang paling stabil dan dominan pada pH rendah.

4.2.3.2 Aroma

Berdasarkan pada lampiran 8 menunjukkan tidak adanya pengaruh pada lama fermentasi, konsentrasi inokulum *Acetobacter aceti*, dan interaksi dari keduanya terhadap aroma yang dihasilkan oleh *vinegar* murbei. Nilai rata-rata secara keseluruhan terhadap aroma *vinegar* murbei menunjukkan nilai 3,77, dimana panelis memberikan respon agak suka terhadap aroma *vinegar* murbei. Uji organoleptik terhadap atribut aroma ini menghasilkan aroma asam khas cuka,

dimana aroma ini dihasilkan dari alkohol yang dirombak menjadi asam asetat oleh *Acetobacter aceti*. Semakin lama fermentasi hingga hari ke-7 aroma *vinegar* murbei semakin meningkat, karena semakin lama fermentasi *vinegar* murbei akan bercita rasa asam dan menghasilkan aroma yang menyengat, tetapi pada hari ke-8 aroma mengalami penurunan. Menurut Yusuf (2004), selama proses fermentasi akan diperoleh enzim-enzim yang memberi aroma khas pada *vinegar* murbei yang dihasilkan.

4.2.3.3 Rasa

Berdasarkan pada lampiran 9 menunjukkan adanya pengaruh pada lama fermentasi, tetapi tidak adanya pengaruh terhadap konsentrasi inokulum *Acetobacter aceti*, dan interaksi dari keduanya pada rasa yang dihasilkan oleh *vinegar* murbei. Nilai rata-rata secara keseluruhan terhadap rasa *vinegar* murbei menunjukkan nilai 3,35, dimana panelis memberikan respon agak tidak suka terhadap rasa *vinegar* murbei. Rasa yang dihasilkan oleh *vinegar* murbei yaitu rasa yang kecut. Hal ini terjadi karena *Acetobacter acetit* telah merombak alkohol menjadi asam asetat sehingga produk *vinegar* murbei yang dihasilkan memiliki rasa yang kecut. Menurut Natalina (2011), rasa asam yang dihasilkan semakin meningkat dari hari ke-1 sampai hari ke-6 dan mengalami penurunan pada hari ke-7. Hal ini disebabkan karena bakteri pengurai alkohol bekerja secara optimum dan gula yang terdapat didalamnya akan mengalami penurunan selama proses fermentasi berlangsung.

Menurut Sir Ossiris (2009), selama proses fermentasi berlangsung *Saccharomyces cereviciae* akan mengurai gula menjadi O_2 dan asam-asam organik serta komponen lain yang dapat memberikan cita rasa yang khas.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

Bab ini menguraikan mengenai : (1) Kesimpulan dan (2) Saran.

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Konsentrasi inokulum *Acetobacter aceti* yang ditambahkan berpengaruh terhadap kadar asam asetat dan kadar alkohol, serta tidak berpengaruh terhadap warna, aroma, dan rasa dari *vinegar* murbei.
2. Lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar asam asetat, kadar alkohol, rasa *vinegar* murbei, serta tidak berpengaruh terhadap warna, dan aroma dari *vinegar* murbei.
3. Interaksi konsentrasi inokulum *Acetobacter aceti* dan lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar asam asetat, kadar alkohol dari *vinegar* murbei, tetapi tidak berpengaruh terhadap warna, aroma, dan rasa *vinegar* murbei.
4. Berdasarkan pengujian kadar asam asetat dan kadar sisa alkohol dengan lama fermentasi 7 hari dan konsentrasi inokulum 11%, dapat disimpulkan kadar asam asetat dan kadar sisa alkohol *vinegar* murbei memenuhi syarat SNI *vinegar*.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat dikemukakan saran sebagai berikut :

1. Dengan alat yang lebih canggih dapat mempermudah dalam melakukan perhitungan jumlah sel agar didapat hasil yang lebih akurat.

2. Perlu dilakukan proses fermentasi dengan menggunakan fermentor dengan adanya agitasi selama fermentasi berlangsung sehingga asam asetat yang dihasilkannya pun lebih baik.
3. Perlu dilakukan pengujian lanjut terhadap cemaran mikroba dan logam pada *vinegar* murbei agar produk lebih aman lagi untuk dikonsumsi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul, Aziz Darwis. 1995. **Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol. Jurnal Penelitian Proses Pembuatan Anggur dari Buah Rambutan.** Jurusan Teknik Kimia. Fakultas Teknik. Universitas Diponogoro. Tembalang.
- Adams. 1985. Dalam Jurnal Ari Susilawati 2001 **“Kajian Awal Pembuatan Vinegar dari Air Kelapa dan Limbah Cair Pembuatan Nata de Coco dengan Metode *Quick Process*.** Jurusan Biologi FMIPA. UNS. Surakarta.
- Agus, Kresno. 2002. **Pengaruh Ragi dalam Proses Fermentasi. Jurnal Penelitian Proses Pembuatan Anggur dari Buah Rambutan.** Jurusan Teknik Kimia. Fakultas Teknik. Universitas Diponogoro. Tembalang.
- Ahmad Sarifuddin. 2007. **Pembuatan Vinegar Dari Limbah Cair Nata de Coco dengan Inokulum *Acetobacteraceti* dan Penambahan Tape Ketan.** ITB. Bandung.
- Bisson. 1991. Dalam Jurnal Mudanifah 2007 **“Proses Pembuatan Kombucha Murbei.** Fakultas Pertanian. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Blanc. 1996.. Dalam Jurnal Mudanifah 2007 **“Proses Pembuatan Kombucha Murbei.** Fakultas Pertanian. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- BPPT. 2005. Dalam Jurnal Deny Utomo 2013 **“Pembuatan Serbuk *Effervescent* Murbei.** Fakultas Pertanian. Universitas Yudharta. Pasuruan.
- Buckle, K.A., 1985. Dalam Jurnal Endang Kwartiningsih 2005 **“Fermentasi Sari Buah Nanas Menjadi Vinegar”.** Fakultas Teknik. Jurusan Teknik Kimia. UNS.
- AOAC. 1990. ***Official Methods of Analysis of The Association of OfficialAnalytical Chemists.*** Washington DC
- Ari Susilowati. 2001. **Kajian Awal Pembuatan Vinegar dari Air Kelapa dan Limbah Cair Pembuatan Nata de Coco dengan Metode *Quick Process*.** Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Jurusan Biologi. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.

- DATTA, R.K. 2002. Dalam Jurnal Dwi Yulistiani 2012 “**Tanaman Murbei Sebagai Sumber Protein Hijauan Pakan Ternak**. Balai Penelitian Ternak. Bogor.
- Daulay. 1999. **Kajian Perbedaan Kondisi Fermentasi Alkohol dan Konsentrasi Inokulum Pada Pembuatan Cuka Salak**. Fakultas Teknologi Pertanian. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Barawijaya. Malang.
- Deny, Utomo. 2013. **Komposisi Kimia Murbei**. Jurnal Teknologi Pangan Vol 5. No 1. Fakultas Pertanian. Universitas Yudharta. Pasuruan.
- Depkes RI. 1995. **Farmakope Indonesia**, Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Dersroiser, N.W. 1988. **Teknologi Pengawetan Pangan**. Universitas Indonesia. Press. Jakarta.
- Dian Widiastuti. 2013. **Proses Pembuatan Anggur dari Buah Rambutan**. Fakultas Teknik. Jurusan Teknik Kimia. Universitas Diponogoro. Tembalang.
- Fardiaz, Winarno. 1984. **Biofermentasi dan Biosintesa Protein**. Angkasa. Bandung.
- Frank, G.W. 1995. ***Kombucha-Healthy Beverage and Natural Remedy from the far east 8th Ed. Publishing House Ennsthaler***. Austria.
- Frazier, W.C, Westhoff D.C, 1988. ***Food Microbiology. 4th edition***. New York : Mc. Graw Hill Book Company.
- Frist Silia. 2013. **Pengaruh Konsentrasi Gula dalam Fermentasi Alkohol**. USU. Medan
- Hardoyono. 2007. **Kondisi Optimum Fermentasi Asam Asetat Menggunakan *Acetobacter aceti***. Balai Besar Teknologi Pati. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Lampung.
- Khoirul, U. 2004. **Optimasi Produksi Asam Asetat**. [www. student.ipb.ac.id](http://www.student.ipb.ac.id). Diakses : 3 Juni 2014.
- Kondo, T dan Kondo, M. 1996. ***Efficient Production of Acetic acid from Glucose in a Mixed Culture of *Zyomonas mobilis* and *Acetobacter sp.**** *Journal of Fermentation and Bioengineering*.

- Kunkee dan Amerine. 1970. Dalam Jurnal Ari Susilawati 2001 **“Kajian Awal Pembuatan *Vinegar* dari Air Kelapa dan Limbah Cair Pembuatan Nata de Coco dengan Metode *Quick Process***. Jurusan Biologi FMIPA. UNS. Surakarta.
- Kumalaningsih. 2006. Dalam Jurnal Mudanifah 2007 **“Proses Pembuatan Kombucha Murbei Kajian Jenis Gula dan Lama Fermentasi”**. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Lay, B.W. 1994. **Analisis Mikrobiologi di Laboratorium**. Raja Grafindo. Jakarta.
- LIPI. 2009. **Pengobatan Alternatif dengan Tanaman Obat**. Balai Informasi Teknologi LIPI.
- Liu, X., G. Xiao, W. Chen, Y. Xu and J. Wu. 2004. *Quantification and purification of Mulberry anthocyanins with macroporus resins*.
- Madigan, M.T. 2002. Dalam Jurnal Mudanifah 2007 **“Proses Pembuatan Kombucha Murbei Kajian Jenis Gula dan Lama Fermentasi”**. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Marx, Jean, L. 1991. **Revolusi Bioteknologi**. Terjemahan : Wilder Yahm. Edisi I. Cetakan I. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- Mudanifah. 2007. **Proses Pembuatan Kombucha Murbei Kajian Jenis Gula dan Lama Fermentasi**. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Nathalina, S. 2011. **Pengaruh Konsentrasi Gula dan Lama Fermentasi Terhadap Mutu Teh Kombucha**. Fakultas Pertanian. Universitas HKBP Nomensen. Medan.
- Nimas Mayang. 2012. **Bioindustri Fermentasi Substrat Padat dan Cair**. Jurusan Teknologi Industri Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Oxtoby, et al. 2003. Dalam Jurnal Ferawalden Erlangga 2009 **“Studi Pembuatan Serat Makanan Dari Tongkol Jagung”**. Departemen Teknologi Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Sumatera Utara. Medan.

- Pingkan Aditiwati. 2003. **Kultur Campuran dan Faktor Lingkungan Mikroorganisme yang Berperan dalam Fermentasi “Tea-Cider”**. Departemen Biologi. FMIPA ITB. Bandung.
- Philip, G .O and Williams, P. A. 2000. *Handbook of Hydrocolloids*. Cambridge. Woodhead Publishing Limited.
- Prescott dan Dunn. 1959. Dalam Jurnal Ananda 2010 **“Kajian Perbedaan Kondisi Fermentasi Alkohol dan Konsentrasi Inokulum Pada Pembuatan Cuka Salak”**. Fakultas Teknologi Pertanian. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Barawijaya. Malang.
- Puturau. 1982. Dalam Jurnal Sir Ossiris 2009 **“Dasar-dasar Fermentasi**. ITP-UB. Malang.
- Rachman. 1989. Dalam Jurnal Sir Ossiris 2009 **“Dasar-dasar Fermentasi**. ITP-UB. Malang.
- Ratnasari, Marlina. 2009. **Pengaruh Konsentrasi Inokulum *Saccharomyces cerevisiae* Terhadap Kadar Asam Asetat Pada Vinegar Kulit Pisang dengan Kultur Campuran**. FPMIPA. Jurusan Biologi. Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.
- Reddy. 2005. **Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol**. Jurnal Penelitian Proses Pembuatan Anggur dari Buah Rambutan. Jurusan Teknik Kimia. Fakultas Teknik. Universitas Diponogoro. Tembalang.
- Rizka. 2013. **Macam-macam Asam Asetat Berdasarkan Metode Fermentasinya**. www.wordpress.com. Diakses : 14 Agustus 2014.
- Rosada, K.K. 1999. **Fermentasi Apel Manalagi (*Molus sylvestris*) dengan Kultur Campuran *Saccharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti***. Skripsi Sarjana Biologi pada Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) ITB. Bandung.
- Rosdiana. 2004. **Vinegar Kulit Pisang**. Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.
- Satiawihardja, I. 1992. **Dasar Fermentasi**. Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Fermentasi. Jurusan Teknik Kimia ITB. Bandung.
- Shuler. 1989. Dalam Jurnal Putra Asga 2006 **“Produksi Etanol Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang Diimobilisasi dengan Agar Batang”**. Jurusan Kimia FMIPA. ITS. Surabaya.

- Sir Ossiris. 2009. **Dasar-dasar Fermentasi**. ITP-UB. Malang.
- Syifa Aulia. 2012. **Teknologi Pengolahan Fermentasi Makanan dan Minuman**. Fakultas Teknologi Industri Pertanian. Jurusan Teknologi Industri Pertanian. UNPAD. Jatinangor.
- Sreeramulu, G., Y. Zhu and W. Knol. 2000. ***Kombucha Fermentation and it's Antimicrobial Activity***. *Journal Agriculture Food Chemistry*.
- Tjahjadi, C dan Marta, H. 2008. **Pengantar Teknologi Pangan (Edisi Pertama)**. Fakultas Teknologi Ilmu Pertanian. Jurusan Teknologi Industri Pangan. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Tjokroadikoesoemo, P.S. 1993. **HFS (*High Fructose Syrup*) dan Industri Ubi Kayu Lainnya**. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Waluyo, S. 1984. **Beberapa Aspek Tentang Pengolahan Vinegar**. Dewa Ruci Press. Jakarta.
- Wood dan Lass . 1985. Jurnal Martiana Andriani “**Studi Kinetika Fermentasi Pada Teh Kombucha**”. Fakultas Pertanian. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian.
- Yusuf, H., Sardjimah, A., dan Poernomo, A. 2004. **Pengaruh Waktu Terhadap Pembentukan Alkohol Secara Enzimatis**. Majalah Farmasi Airlangga. Bagian Kimia Farmasi. Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga.